

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**CONVERGENCIA DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y ESTRÉS  
OXIDATIVO COMO MODELO CELULAR DE NEURODEGENERACIÓN**

María del Carmen Vicente Cenzano  
Diciembre 2006





Memoria presentada por  
**MARÍA DEL CARMEN VICENTE CENZANO**  
Para aspirar al Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**  
(BIOLOGÍA MOLECULAR)

Directores de esta tesis:

MARÍA RECUERO VICENTE  
Dra. en Ciencias Químicas  
(Biología Molecular)

y

FERNANDO VALDIVIESO AMATE  
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Madrid, Diciembre 2006



El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, gracias a un beca financiada por la Fundación Ramón Areces.



A la memoria de mis padres

*<<Hay personas que luchan un día y son buenas, las hay que luchan un año y son mejores. Hay personas que luchan muchos años y son muy buenas, pero hay quienes luchan toda la vida y esas son las imprescindibles.>>*

*Beltor Brecht*



Hacer un balance de estos seis años para no olvidarme de ninguna persona que, de una forma u otra, han contribuido a la realización de esta tesis no es fácil. Dos de esas personas que, sin lugar a dudas, son directamente responsables de todo este trabajo son Fernando Valdivieso y María Recuero.

A Fernando no sólo tengo que agradecerle que confiara en mí, sino que, además, su trato cercano y su comprensión y apoyo en los momentos difíciles me han sido de gran ayuda. A Mary darte las gracias por tus enseñanzas y por tu infinita paciencia, menos mal que tus nervios son el secreto mejor guardado... que si no está tesis te hubiera supuesto la visita a algún que otro hospital psiquiátrico.

De mis compañeros del 340 que decir, supongo que todos te marcan de alguna manera, tanto los que se fueron; Mónica, Elena, Gema, Piernas y Ana, como los que se acaban de ir, los que se quedan o los que acaban de llegar como Diego o Cristian. A Sori y a Teresa porque aunque hace poco que nos conocemos ha merecido la pena. A Anita por tu ayuda desinteresada y a Raquel por demostrarme que hay más de una visión de la vida. A Mariaje y a Isabel por lo que he aprendido de vosotras (la experiencia es un grado) y a Loreto por ayudarme con el papeleo.

A los que no sólo fueron compañeros de trabajo sino amigos, gracias por vuestra amistad, nunca se me olvidaran esos ratos en la Barraca. Gracias Julio por tu apoyo y por esos momentos compartidos en torno a una tarta a los tres chocolates (si alguna vez publico un cell prometo hacerte una camiseta). Como me iba a olvidar de... ¿Cómo se llama?... si, hombre, iel chavalito del atletil!... gracias por esos grandes monólogos, no cambies nunca. A Bisbal, quiero decir Juan, no pierdas nunca tu sentido del humor ni esa chilena con salto mortal que tantos desgarros te ha acarreado. A M<sup>a</sup> Carmen y a Esther, esa delantera de oro, gracias por compartir conmigo tantas cosas, que sería del Valdecediez sin vuestros goles. A Jesus (¿o era Julio?) por dejarme el monstruo sin protestar. A Junior y a Jor-gin sólo os puedo decir que ha sido un placer y .... ique corran los gintonics!.

A Antonio García y a Manuela gracias por dejarme cacharrear en vuestro laboratorio. A Mercedes por ayudar a esta okupa siempre que lo he necesitado. A Javi y Rafa, la de tardes que nos abremos pasado mirando mis celulitas, gracias por vuestro tiempo y vuestra amistad. A Camilo, Mónica Angelo, Espe, Laura y Teresa por esos ratos compartidos.

A Pedro Carmona por ayudarme en ese complicado mundo de los Microarrays.

A los "fedes", gracias Espe, Little, Antuan, Carlota, Alicia y Elvira por hacer más amenas las comidas.

A los del 330, gracias por aguantar a esta pedigüeña pesada, y a la gente del CX con la que he compartido estos años.

A Jose Félix, Esteban, Paichon, Hector y todos los demás que amenizaban esas tardes de jueves en esos partiditos y sobre todo ese tercer tiempo en la terracita.

A Vega, Ricardo, Luis, Charli y Santi por esos partiditos de volei en la playa de la autónoma.

A los servicios del CBM que nos hacéis un poco más fácil este trabajo, gracias Mada por solucionarnos todos los problemas y atendernos siempre con una sonrisa.

A mis compañeros de Alcalá; Zangui, Ludo, Olga, Inma, Alf, Lucky, Tono, Jaime, Tichu, Chaque, Julio, Jarry, Yoli, Chisti y Martina, y sobre todo al negrito, Juancar y Encarni (porque aunque no nos veamos mucho siempre estais ahí), como olvidarme de esas tapitas en el Indalo y esas fiestas en los hangares, en la casa del Zangui o en el pueblo del Chaque.

A mis compañeros de bioquímica: Juanfra (aunque aún no me ha devuelto las fotos de Marruecos), Rafa, Fer, Ángel, Ana, Chus, Eva, Gloria, Laura, Pablo, Raquel, Charo, Antonio, Marta y Elisse.

A Veneno por no ser sólo mi "Mestre", sino también mi amigo. A mis amigos de Capoeira; Camino (por fin ya no te daré más la brasa con la tesis), Marisa (mi rubia platino

favorita), Manolo (por demostrarme que hay gente más desastre que yo), Cristina, Chema, Vero, Eloy, Javi y Alicia (mis canarios favoritos), Samurai y Laura, Ruso, Ernesto, Güily, Joaquín, Jose, Adrian, Beltran, Bea, el pájaro, Josele, Laura, Richi, Jose, Alfonso, Alvaro, estefanía,... Y todos los que habéis aguantado mis estreses.

A mis compañeros de volei: Carlos, Mer, Jose, Carloncho, Juanma, Belen, Pedro, Sergio, el bombero, Bea, Cris, Susan, Diego, Jesús, Rocío, Mónica, Miguel, Mario, Olga, Oscar y, como no, a mi entrenador Cesar. Gracias a todos por aguantar mis nervios y mis despiestes.

A la gente de Aluche, Juninho (por ser mi compi te has comido todos mis berrinches), Pablo, Merche, los tripas, Torro, Conchi, Ruge, Quimba, Yanqui, Toñi, Quiti, Laura, Reguera, Almudenilla, Teo, Ana, Oscar, Rober, Alex, Esther y Mime (os debo un desayuno con champán), Elena y Manu, Yoli,... gracias por ser mis amigos.

A Pedro porque hay personas de las que merece la pena aprender, gracias por darme tu amistad; a Sisco por demostrarme que hay catalanes salerosos y, a Angels, por enseñarme que aún queda gente a las que las injusticias no les pasan desapercibidas.

A mi mejor amiga, Sole, porque me ha demostrado que hay familia con la que no naces, sino que la consigues a lo largo de la vida. A mi hermano, gracias por aguantarme toda la vida y sobre todo estos últimos meses, pero al fin todo llega. A Carlos gracias por estar ahí en los momentos difíciles y aguantar mis malas pulgas, gracias por compartir conmigo tantas cosas.

A toda mi familia no os nombro a todos porque sois muchos, pero si que quiero agradecerse en especial a mi tío Cesar y a mi abuela, que empezaba a pensar que se había quedado sin nieta.

Y sobre todo, esta tesis se la debo a mis padres, que sin sus enseñanzas, su confianza y su cariño, nunca hubiera llegado a donde estoy. A ti papa por enseñarme que la dignidad y la lucha nos convierten en mejores personas, y a ti mama por que nunca te rendiste y me demostraste que luchando se pueden conseguir grandes cosas. Lo único que lamento es que ellos no puedan estar conmigo este día, porque creo que esta tesis es también obra suya.



Índice

---



<b>RESUMEN/SUMMARY .....</b>	<b>23</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>27</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>1.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....</b>	<b>35</b>
<b>1.2. ESTRÉS OXIDATIVO (EO) .....</b>	<b>37</b>
1.2.1. EO y calcio .....	40
1.2.2. EO y apoptosis .....	41
<b>1.3. ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (ERE) .....</b>	<b>44</b>
1.3.1. Respuesta al mal plegamiento de proteínas (UPR) .....	44
1.3.2. Respuesta a sobrecarga en el RE (EOR) .....	47
1.3.3. Estrés de retículo endoplásmico y calcio .....	47
1.3.4. Estrés de retículo endoplásmico y apoptosis .....	48
1.3.5. Respuesta integrada a estrés .....	50
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1. REACTIVOS .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2. CULTIVOS CELULARES .....</b>	<b>59</b>
3.2.1. Línea celular .....	59
3.2.2. Tratamientos de estrés oxidativo y de estrés de RE .....	59
<b>3.3. ANTICUERPOS .....</b>	<b>60</b>
<b>3.4. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS .....</b>	<b>60</b>
3.4.1. Obtención de lisados celulares .....	60
3.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) .....	60
3.4.3. Inmunomarcado después de electroforesis en geles de poliacrilamida ("Western blot") .....	61
<b>3.5. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR .....</b>	<b>61</b>
3.5.1. Fundamento de la técnica .....	61
3.5.2. Ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) .....	61
<b>3.6. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO         (ROS) .....</b>	<b>61</b>
3.6.1. Fundamento de la técnica .....	61
3.6.2. Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	62
3.6.3. Ensayo de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa .....	62
<b>3.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO CITOSÓLICO LIBRE. 62</b>	
3.7.1. Fundamento de la técnica .....	62
3.7.2. Medida de la concentración de calcio citosólico libre .....	63
3.7.3. Medida de calcio citosólico libre en célula única cargada con fluo-4 .....	64

<b>3.8. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....</b>	<b>64</b>
3.8.1. Fundamento de la técnica .....	64
3.8.1. Medida de la despolarización de la membrana mitocondrial .....	65
3.8.2. Medida de la despolarización de la membrana mitocondrial en célula única cargada con fluo-4 .....	65
<b>3.9. DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE CITOCROMO C AL CITOSOL .....</b>	<b>65</b>
3.9.1. Fundamento de la técnica .....	65
3.9.1. Ensayo elisa “sandwich” para la cuantificación de citocromo c liberado al citosol .....	65
3.9.2. Determinación de la liberación de citocromo c por inmunocitoquímica .....	65
<b>3.10. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO .....</b>	<b>66</b>
3.10.1. Fundamento de la técnica .....	66
3.10.2. Análisis de la progresión del ciclo celular por citometría de flujo .....	66
3.10.3. Activación de caspasa 3 .....	66
<b>3.11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL POR RT-PCR EN ARRAY. 67</b>	
3.11.1. Aislamiento del RNA total .....	67
3.11.2. Síntesis de cDNA por retrotranscripción .....	68
3.11.3. PCR cuantitativa en array .....	68
<b>3.12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y GENOMICA     FUNCIONAL POR MICROARRAY DE cDNA .....</b>	<b>68</b>
3.12.1. Microarrays de cDNA .....	68
3.12.2. Análisis de expresión diferencial .....	69
3.12.3. Análisis genómico funcional .....	69
<b>3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1. DEFINICIÓN DE UN MODELO CELULAR DE CONVERGENCIA DE ESTRÉS     DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (ERE) Y DE ESTRÉS OXIDATIVO (EO) .....</b>	<b>73</b>
4.1.1. Modelo celular de ERE .....	73
4.1.2. Modelo celular de EO .....	74
4.1.3. Implicación del calcio en los modelos celulares de ERE y de EO .....	77
4.1.4. Modelo celular de convergencia de ERE y EO .....	80
4.1.4.1. Expresión de Grps, viabilidad celular y producción de ROS .....	80
4.1.4.2. Implicación del Ca <sup>2+</sup> en el modelo de convergencia de estreses .....	82
4.1.4.3. Variación del potencial de membrana mitocondrial en el modelo de convergencia de estreses .....	84
<b>4.2. RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS (RIE) EN EL MODELO CELULAR     DE CONVERGENCIA DE ERE Y EO .....</b>	<b>85</b>

4.2.1. Ruta de señalización de supervivencia .....	88
4.2.2. Ruta de señalización a muerte .....	91
<b>4.3 APOPTOSIS EN EL MODELO CELULAR DE COEXISTENCIA DE ERE + EO .....</b>	<b>93</b>
4.3.1. Incremento de la disfunción mitocondrial por ERE en presencia de EO .....	95
4.3.2. Incremento en la señal apoptótica dependiente de caspasas por ERE en presencia de EO .....	97
4.3.3. Incremento de la apoptosis por ERE en presencia de EO .....	98
<b>4.4 . ANÁLISIS DE EXPRESION GENICA DIFERENCIAL Y GENÓMICA FUNCIONAL DEL MODELO CELULAR DE NEURODEGENERACION .....</b>	<b>99</b>
4.4.1. Estudio de la expresión génica diferencial .....	99
4.4.1.1. Estudio de la expresión génica mediante Microarrays de DNA .....	99
4.4.1.2. Validación mediante cuantificación de la expresión génica por RT-PCR en array .....	100
4.4.1.3. Análisis funcional de los genes sobreexpresados y reprimidos .....	118
4.4.1.4. Selección de genes candidatos a estudios funcionales .....	120
4.4.2. Analisis genómico funcional mediante Microarrays de DNA .....	122
4.4.2.1. Análisis funcional de los modelos de EO, ERE y ERE+EO .....	122
4.4.2.2. Análisis de la expresión génica de las rutas de la RIE mediante Microarrays de DNA .....	124
a) La respuesta integrada a estrés (RIE) .....	124
b) Señalización del calcio por el RE .....	130
c) El incremento del calcio citosólico y la EOR .....	131
d) La apoptosis mitocondrial .....	133
4.4.2.3. Progresión del ciclo celular en los modelos de ERE, EO y ERE+EO .....	134
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>137</b>
<b>5.1. MODELO NEURONAL DE CONVERGENCIA DE ERE Y EO .....</b>	<b>139</b>
<b>5.2. RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS (RIE) EN EL MODELO CELULAR DE ERE+EO .....</b>	<b>141</b>
<b>5.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y GENÓMICA FUNCIONAL DEL MODELO CELULAR DE NEURODEGENERACION .....</b>	<b>144</b>
<b>5.4. ANÁLISIS GENÓMICO DE LA RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS .....</b>	<b>146</b>
<b>5.5. MODELOS DE CONVERGENCIA DE ERE Y EO PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA NEURODEGENERACION .....</b>	<b>147</b>

<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>149</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>153</b>

## Índice de tablas y figuras

---





**ÍNDICE DE TABLAS**

R.1. Clasificación de los 30 genes más sobreexpresados en ERE .....	101
R.2. Clasificación de los 30 genes más reprimidos en ERE .....	102
R.3. Clasificación de los 30 genes más sobreexpresados en EO .....	103
R.4. Clasificación de los 30 genes más reprimidos en EO .....	104
R.5. Clasificación de los 30 genes más sobreexpresados en ERE + EO .....	105
R.6. Clasificación de los 30 genes más reprimidos en ERE + EO .....	106
R.7. Genes sobreexpresados coincidentes en los tres modelos: ERE, EO y ERE + EO .....	107
R.8. Genes sobreexpresados coincidentes en ERE y EO .....	108
R.9. Genes reprimidos coincidentes en los tres modelos: ERE, EO y ERE + EO .....	109
R.10. Genes reprimidos coincidentes en ERE y EO .....	110
R.11. Descripción de los genes que alteran su expresión génica, por RT-PCR en array, en ERE y EO ...	112
R.12. Comparación del cambio de la expresión génica analizado por Microarray de cDNA o por RT-PCR en array .....	118
R.13. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes sobreexpresados .....	119
R.14. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes reprimidos .....	120
R.15. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes sobreexpresados en EO .....	125
R.16. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes reprimidos en EO .....	125
R.17. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes sobreexpresados en ERE .....	126
R.18. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes reprimidos en ERE .....	126
R.19. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes sobreexpresados en ERE + EO .....	127
R.20. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes reprimidos en ERE + EO.....	128
R.21. Cambio en la expresión génica de la respuesta UPR analizada por Microarray de DNA .....	129
R.22. Cambio en la expresión génica de la señalización del calcio en el RE analizada por Microarray de DNA .....	131
R.23. Cambio en la expresión génica de la señalización EOR mediada por calcio analizada por Microarray de DNA .....	132
R.24. Cambio en la expresión génica de la ruta apoptótica mitocondrial analizada por Microarray de DNA .....	133
R.25. Cambio en la expresión génica del ciclo celular analizado por Microarray de DNA .....	135

**ÍNDICE DE FIGURAS**

I.1. Reacción radicalaria mediada por la xantina .....	36
I.2. Esquema de la producción de estrés oxidativo .....	38
I.3. Consecuencias de la alteración de la homeostasis del calcio .....	39
I.4. Rutas apoptóticas producidas por EO .....	40
I.5. Proceso de glicosilación de las proteínas en el retículo endoplásmico .....	41
I.6. Neurodegeneración y estrés de RE .....	43
I.8. Control de la homeostasis del calcio por el RE .....	46

I.9. Rutas apoptóticas producidas por ERE .....	48
I.10. Respuesta integrada a estrés .....	50
M.1. Fórmula de la sonda Fluo-4 .....	63
M.2. Sondas fluo-3 y fluo-4 .....	63
M.3. Fórmula de la sonda .....	64
M.4. Esquema de la actividad de la sonda Taiman-MGB .....	67
R.1. Expresión de Grp78/Bip y Grp94 y daño celular inducidos por ERE .....	73
R.2. Cinética de la expresión de Grps inducida por ERE .....	74
R.3. Expresión de Grp78/Bip y Grp94, y daño celular inducidos por EO .....	75
R.4. Efecto de X-XOD y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la producción de ROS .....	75
R.5. Cinética de expresión de Grps inducida por EO .....	76
R.6. Efecto del TMB-8 sobre la expresión de las Grps inducida por ERE .....	77
R.7. Efecto del TMB-8 sobre la expresión de las Grps inducida por EO .....	78
R.8. Efecto del TMB-8 sobre el daño celular inducido por ERE .....	78
R.9. Efecto del TMB-8 sobre el daño celular inducido por EO .....	79
R.10. Niveles de calcio intracelular con ERE, en presencia o ausencia de TMB-8 .....	79
R.11. Niveles de calcio intracelular con EO, en presencia o ausencia de TMB-8 .....	80
R.12. Tm en presencia de X-XOD: expresión de Grps, viabilidad celular y producción de ROS .....	81
R.13. ERE en presencia de EO: niveles de calcio intracelular en presencia o ausencia de TMB-8 ....	82
R.14. ERE en presencia de EO: implicación de la reentrada de calcio del medio extracelular en los niveles de calcio intracelular .....	83
R.15. ERE en presencia de EO: niveles de calcio intracelular medido por célula única .....	84
R.16. ERE en presencia de EO: despolarización de la membrana mitocondrial medida en célula única .....	85
R.17. Estudio cinético de la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC: quinasas que activan la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ .....	86
R.18. Expresión de eIF2 $\alpha$ y activación de su fosforilación .....	87
R.19. Estudio cinético de la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC: activación de la ruta ATF4 .....	88
R.20. Estudio cinético de la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC: los transductores del RE independientes de la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ .....	89
R.21. Estudio cinético de la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC: ruta de señalización de supervivencia vía UPR .....	90
R.22. Estudio cinético de la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC: ruta de señalización a muerte vía UPR .....	92
R.23. ERE en presencia de EO incrementa la apoptosis inducida por ERE .....	93
R.24. ERE en presencia de EO incrementa el daño celular .....	94
R.25. Incremento en la liberación de citocromo c de la mitocondria por ERE en presencia de EO ...	96
R.26. Incremento de la señal apoptótica dependiente de caspasas por ERE en presencia de EO .....	97

---

R.27. Incremento en muerte apoptótica con ERE en presencia de EO .....	98
R.28. Secuencias génicas cuya expresión cambia en EO, ERE y ERE + EO (Microarrays de DNA de Affymetrix) .....	99
R.29. Comparación entre los modelos celulares de estrés del número de secuencias génicas cuya expresión cambia .....	100
R.30. Estudio cinético de la expresión génica en neuroblastoma humano SKNMC tras el tratamiento con Tm .....	114
R.31. Estudio cinético de la expresión génica en neuroblastoma humano SKNMC tras el tratamiento con X-XOD .....	116
R.32. Estudio cinético de la expresión génica en SKNMC: genes de interés .....	121
R.33. Análisis de expresión diferencial de ERE, EO y ERE + EO (Microarray de DNA de Applied Biosystems) .....	122
R.34. Análisis del coeficiente de correlación para los Microarrays de Affymetrix y Applied Biosystems de los genes sobreexpresados en los modelos de ERE, EO y ERE + EO .....	123
R.35. EOR y calcio .....	132
R.36. Efecto de los modelos de ERE, EO y ERE + EO sobre la progresión del ciclo celular analizado por citometría de flujo .....	134



Summary

---



The best established risk factor for Alzheimer's disease is age, which is intimately involved with oxidative stress. The induction of endoplasmic reticulum (ER) stress was recently reported to be involved in Alzheimer's disease (AD). In addition, presenilin-1 (PS1) mutations have been associated with vulnerability to ER stress. Studies in model neuronal-origin cells suffering ER and oxidative stress, mimicking the situation in AD brains, are therefore of great interest. This thesis reports that, in the SK-N-MC human neuroblastoma cell line, ER-specific stress produced by tunicamycin in the presence of oxidative stress produced by the xanthine/xanthine oxidase system leads to increased cell injury, higher cytosolic calcium concentrations, and a greater production of reactive oxygen species (ROS). Further, ER stress in the presence of oxidative stress enhances the Integrated Stress Response (ISR), such the survival machinery (unfolded protein response, UPR) as the cell death. ER stress in the presence of oxidative stress enhances CHOP expression (a marker of cell death caused by ER stress) and leads to increased apoptosis induced by the increased release of mitochondrial cytochrome c to the cytosol, the activation of caspase 3, and the degradation of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). This increase in apoptosis was confirmed by quantifying DNA fragmentation using flow cytometry. cDNA Microarrays were used to identify genes with changes in the expression in response to ER stress in the presence of oxidative stress. In this thesis, we suggest a neuronal model of induction of ER stress in concert with oxidative stress to study the molecular mechanisms of AD-associated neurodegeneration.





## Abreviaturas

---



---

4-HNE .....	4- Hidroxinonenal
ADP .....	Adenosil difosfato
AIF .....	Factor inductor de apoptosis
Apaf1 .....	Factor de activación de la apoptosis 1
ApoE .....	Apolipoproteína E
ApoE $\epsilon$ 4 .....	Alelo $\epsilon$ 4 del gen de la apolipoproteína E
ApoE4 .....	Isoforma 4 de la apolipoproteína E
APP .....	Proteína precursora del $\beta$ -amiloide
ASK1 .....	Isoforma 1 de la quinasa reguladora de la señal de apoptosis
ATCC .....	Colección americana de cultivos tipo
ATF4 .....	Isoforma 4 del factor activador de la transcripción
ATF6 .....	Isoforma 6 del factor activador de la transcripción
ATM .....	Ataxia-telangiectasia mutada
ATP .....	Adenosil trifosfato
AVPI .....	Secuencia de unión a XIAP -Ala-Val-Pro-Ile
AVPS .....	Secuencia de unión a XIAP -Ala-Val-Pro-Ser
A $\beta$ .....	Péptido $\beta$ -amiloide
Bak .....	Antagonista homólogo de Bcl2 ( <i>killer</i> )
Bax .....	Bcl2 asociada a proteína X
Bcl2 .....	Proteína 2 reguladora del programa apoptótica identificada en linfoma de células B
Bid .....	Agonista del dominio de muerte que interacciona con BH3
Bim .....	Proteína de interacción con Bcl2
Bip .....	Proteína de unión a inmunoglobulina
BSA .....	Seroalbúmina bovina
bZIP .....	Dedos de leucina básicos
c/EBP .....	CCAAT/potenciador de la unión de proteínas
Ca <sup>2+</sup> .....	Ión calcio
CARD .....	Dominio de reclutamiento de caspasas
CHOP .....	Proteína homóloga a c/EBP
c-jun .....	Factor de transcripción AP-1 (jun viene del japonés “ju-nana”)
C-t .....	Extremo carboxilo terminal
Da .....	Dalton
DAPI .....	Dihidrocloruro de 4,6-diamino-2-fenilindol
dATP .....	Desoxiadenosil trifosfato
DMSO .....	Dimetilsulfóxido
DNA .....	Ácido desoxiribonucleico
dNTP .....	Desoxinucleótidos trifosfato
EA .....	Enfermedad de Alzheimer
EDEM .....	$\alpha$ -manosidasa activadora de la degradación
EDTA .....	Ácido etilen-diamino-tetraacético
EGTA .....	Ácido etilen-glicol-bis( $\beta$ -aminoetileter)N,N,N',N'-tetraacético
eIF2 $\alpha$ .....	Isoforma 2 subunidad $\alpha$ del factor de iniciación de la traducción en eucariotas
eIF2 $\alpha$ S51A/S51A .....	Mutación de una adenina por una serina en la posición 51 de la eIF2 $\alpha$
ELA .....	Esclerosis lateral amiotrófica
EO .....	Estrés oxidativo
EOR .....	Respuesta a sobrecarga en el retículo
EP .....	Enfermedad de Parkinson
ERA .....	Elementos de respuesta antioxidante
ERAD .....	Degradación asociada al retículo endoplásmico
ERE .....	Estrés del retículo endoplásmico
erp72 .....	Proteína marcadora del RE de 72KDa

---

ERSE	Elemento de respuesta a ERE que actúa en cis
FAD	Enfermedad de Alzheimer familiar
FCS	Suero bovino fetal
Fe (II)	Hierro (II)
GADD153	Isoforma 153 del gen inductor de daño al DNA y parada del ciclo
GADD34	Isoforma 34 del gen inductor de daño al DNA y parada del ciclo
GCN2	Quinasa encargada del control general del metabolismo del nitrógeno
Grp78	Proteína regulada por glucosa de 78KDa
Grp94	Proteína regulada por glucosa de 94KDa
GSH	Glutation
GSHPx	Glutation peroxidasa
GSHRd	Glutation reductasa
H2DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
H2O2	Peróxido de hidrógeno
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HRI	Quinasa inhibidora de la hemoregulación
HSV-1	Herpes simplex virus tipo 1
IAP	Inhibidores de la apoptosis
InsP3	Inositol trifosfato
InsP3R	Receptor del inositol-1,4,5-trifosfato
IRE1	Proteína que requiere inositol 1
IRE1 $\alpha$	Isoforma $\alpha$ de la proteína que requiere inositol 1
IRE1 $\beta$	Isoforma $\beta$ de la proteína que requiere inositol 1
I $\kappa$ B	Inhibidor de NF $\kappa$ B
I $\kappa$ K	Quinasa inhibidora de $\kappa$ B
I $\kappa$ K $\alpha$	Isoforma $\alpha$ de la quinasa inhibidora de $\kappa$ B
I $\kappa$ K $\beta$	Isoforma $\beta$ de la quinasa inhibidora de $\kappa$ B
JNK	Quinasa del N-t de c-jun
KDa	Kilodalton
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
M-24	Placas de 24 pocillos
M-6	Placas de 6 pocillos
M-96	Placas de 96 pocillos
MAPKKK	Quinasa quinasa quinasa activadora de mitógeno
MCF-7	Fibroblastos de cancer de mama
MCP	Muerte celular programada
MDA	Malondialdehído
MEFs	Fibroblastos de embriones de ratón
MEM	Medio esencial de Eagle modificado
MP	Membrana plasmática
mRNA	RNA mensajero
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidrogenado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidrogenado
NF- $\gamma$	Factor de transcripción nuclear subunidad $\gamma$
NF $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
NIK	Quinasas inductoras de NF $\kappa$ B
Nrf	Factores nucleares respiratorios
Nrf2	Isoforma 2 de los factores nucleares respiratorios
nt	Nucleótido
N-t	Extremo amino terminal

---

O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxilo
Omi	Serinproteasa con actividad HtrA
ORP150	Proteína de 150KDa reguladora del oxígeno
p.e.	Por ejemplo
p110 ATF6	Isoforma de ATF6 de 110KDa
p50 ATF6	Fragmento de 50KDa del procesamiento de ATF6
p90 ATF6	Isoforma de ATF6 de 90KDa
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PERK	Quinasa PKR relacionada con el RE
PKC	Proteína quinasa C
PKR	Proteína quinasa activadora del RNA de doble cadena
PLA2	Fosfolipasa 2
PLA2G3	Grupo 3 de la fosfolipasa 2
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
PTP	Poro de transición de la permeabilidad
RE	Retículo endoplásmico
RIE	Respuesta integrada a estrés
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Enzimas que degradan el RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RyR	Receptor de rianodina
S1P	Proteasas del sitio 1
S2P	Proteasas del sitio 2
SAPK	Proteína quinasa inductora de estrés
SDS	Sulfato sódico de dodecilo
SEM	Desviación estándar de la media
SERCA	Bomba ATPasa sarcoplásmica/RE
Smac	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
Tau	Proteína asociada a microtúbulos
TEMED	N,N,N,N-Tetrametil etil endiamina
Tg	Tapsigargina
Tm	Tunicamicina
TMB-8	8-N,N-dietilamino-octil-3,4,5-trimetoxibenzoato
TMRE	Tetrametilrodamina etil éster
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF2	Factor 2 asociado al receptor TNF
UPR	Respuesta a mal plegamiento de proteínas
UPRE	Elemento de respuesta a mal plegamiento de proteínas
VEKD	Tetrapéptido de Val-Glu-Lys-Asp
VETD	Tetrapéptido de Val-Glu-Thr-Asp
X	Xantina
XBP1	Isoforma 1 de la proteína ligada a la caja X
XIAP	Inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X
XOD	Xantina oxidasa

---

Z-VAD-fmk ..... N-benziloxycarbonil-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona

## Introducción

---





## 1.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA), descrita por primera vez en 1907 por Alois Alzheimer [Alzheimer, 1907], es un proceso neurodegenerativo cuya prevalencia aumenta con la edad, afectando aproximadamente al 5% de las personas mayores de 65 años y hasta el 30-40% de los mayores de 85 años. Se caracteriza principalmente por la pérdida neuronal y la alteración de los procesos sinápticos localizados en la corteza cerebral, particularmente en los lóbulos frontal y temporal y en el hipocampo.

La de Alzheimer es una enfermedad que afecta a la memoria temprana, produciendo demencia, como consecuencia de la distrofia de neuritas, pérdida sináptica, gliosis (astrocitos reactivos), activación de la microglia, depósitos amiloides perivasculares y pérdida de células neuronales por apoptosis. El diagnóstico definitivo se realiza *postmortem*, identificando la presencia de los rasgos histopatológicos característicos de los cerebros de los pacientes de EA: la formación de depósitos extracelulares de una proteína llamada  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), denominadas placas seniles; y la aparición de ovillos neurofibrilares constituidos por una proteína asociada a microtúbulos, Tau, hiperfosforilada. Se ha establecido una relación directa entre la severidad de la demencia y la presencia de estas marcas histopatológicas (Oyebode y cols., 1986).

Desde el punto de vista clínico, la EA se ha clasificado en función de la edad de aparición de los síntomas y de la forma de herencia. En cuanto a la edad, se distingue entre formas preseniles, que se manifiestan antes de los 60 años de edad; y formas seniles, con una aparición de los síntomas posterior a los 60-65 años. Atendiendo a criterios genéticos, se clasifica en EA monogénica, que aparece y se caracteriza por presentar un patrón de herencia autosómico dominante; y en EA esporádica, que aparece después de los 65 años y presenta una limitada agregación familiar.

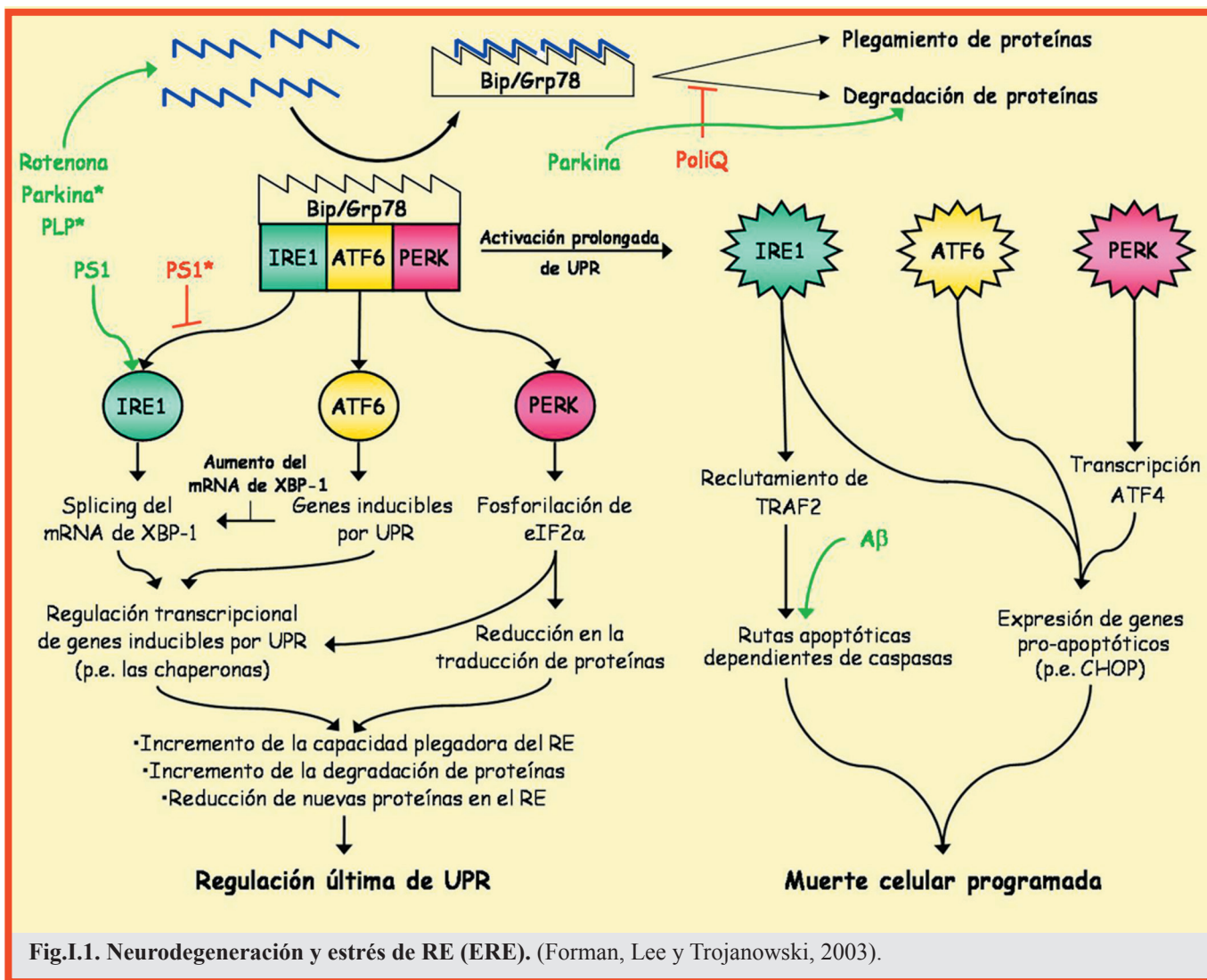
**La enfermedad de Alzheimer familiar (FAD)** o de aparición temprana, afecta a menos del 1% de los pacientes y se caracteriza por mutaciones en los genes de la presenilina 1, PS1 (cromosoma 14) (Sherrington y cols., 1995), presenilina 2, PS2 (cromosoma 1) (Levy-Lahad y cols., 1995b; Rogaev y cols., 1995) y de la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide, APP (cromosoma 21) (Goate y cols., 1991). En todos los casos se produce un aumento de los niveles del péptido  $A\beta$  de 42 aminoácidos (Scheuner y cols., 1996).

**La enfermedad de Alzheimer esporádica** o de aparición tardía (99% de los pacientes de EA), es un síndrome en el que intervienen tanto factores genéticos como ambientales. El factor de riesgo genético más importante asociado a la EA esporádica es el alelo  $\epsilon 4$  del gen de la apolipoproteína E (ApoE- $\epsilon 4$ ) y el riesgo es dependiente de la dosis alélica (Corder y cols., 1993; Saunders y cols., 1993). Sin embargo, la presencia de este alelo no es suficiente para desarrollar la enfermedad (Richard y Amouyel, 2001).

Las protofibrillas y oligómeros de los péptidos  $A\beta 40$  y el  $A\beta 42$ , presentes en las placas seniles, y que se originan por el procesamiento proteolítico del APP, causan disfunción neuronal (Bossy-Wetzel y cols., 2004). Tanto el  $A\beta 40$  como el  $A\beta 42$ , adoptan estructuras helicoidales variables y particulares, dependientes de su unión a membrana, la quelación de metales y de la interacción con otros péptidos. La unión a metales induce un cambio conformacional a una lámina- $\beta$ , dando como resultado la agregación (Rangachari y cols., 2006).

Más de 100 mutaciones han sido identificadas en los genes de la PS1 en la EA familiar o de aparición temprana (Hutton y cols., 1998). Experimentos en cultivos celulares y ratones transgénicos revelan que estas mutaciones dan como resultado un incremento en la deposición de  $A\beta 40$  y 42 (Borchelt y cols., 1997; Scheuner y cols., 1996). A la inversa, un ratón deficiente en PS1 tiene disminuida la producción de  $A\beta 40$  y 42 (De Strooper y cols., 1998; Naruse y cols., 1998), sugiriendo que la PS1 juega un papel principal en la actividad  $\gamma$ -secretasa.

Es de particular interés que la proteína regulada por glucosa de 78 KDa, Grp78 (chaperona del retículo endoplásmico, RE), interaccione con el APP y reduzca los niveles de secreción de  $A\beta 40$  y  $A\beta 42$  (Yang y cols., 1998), y que los niveles de Grp78 y Grp94 estén disminuidos en EA (Katayama y cols., 1999). Estudios recientes sobre la respuesta a mal plegamiento de proteínas (UPR) revelan niveles incrementados de Grp78 (también conocida como proteína de unión a inmunoglobulina, Bip) y la proteína quinasa relacionada con el retículo PERK en cerebros de EA (Hoozemans y cols., 2005; Lindholm y cols., 2006). También se ha descrito que PS1 mutante regula negativamente la respuesta a estrés en el RE (Katayama y cols., 1999), sugiriendo un papel de posibles alteraciones del RE en el proceso patológico (Fig.I.1).



El factor de riesgo mejor establecido para la EA es la edad. Y, el estrés oxidativo (EO) asociado a ella, se considera importante en la patogénesis de la EA (Eckert y cols., 2003; Zhu y cols., 2003). Un gran número de estudios muestran EO en cerebros y tejidos periféricos de pacientes con EA y en modelos animales de EA (Gibson y Huang, 2005).

El oxígeno es necesario para la vida pero, paradójicamente, como un subproducto de su metabolismo, se producen las especies reactivas de oxígeno (ROS), que son altamente tóxicas para las células. Los tejidos *postmortem* de cerebros de pacientes con enfermedades neurodegenerativas tales como: enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA), claramente presentan niveles incrementados de ROS en las correspondientes regiones afectadas del cerebro (Beal y cols., 1997; Dexter y cols., 1989; Hensley y cols., 1998). Desafortunadamente es imposible discernir de esta observación si el estrés oxidativo (EO) es una causa o meramente una consecuencia asociada a la pérdida neuronal.

Aunque el envejecimiento se considera un proceso multifactorial, existen evidencias significativas que implican a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la correspondiente respuesta a EO como factores claves determinantes de la longevidad (Finkel y Holbrook, 2000). Muchas de estas evidencias son correlativas, como la relación entre velocidad metabólica y duración de la vida y, también, la observada entre un incremento en el daño oxidativo y la edad. La identificación reciente de genes que influyen en la longevidad, apoyan la conexión mecánica entre oxidantes, estrés y envejecimiento. Aunque se acepta que el estrés oxidativo contribuye al envejecimiento, no se conoce si las ROS (aniones superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno) actúan como agentes destructores o como reguladores de las vías ligadas a la respuesta a estrés y al envejecimiento. Tampoco está muy claro, si es el nivel absoluto de estrés oxidativo o, si son las respuestas a estrés o, quizás, una combinación de ambas, las que determinan la expectativa de vida.

El cerebro, debido a su alta actividad metabólica y a su relativamente reducida regeneración celular en comparación con otros órganos, es particularmente susceptible a los efectos tóxicos de ROS. Han sido identificados marcadores de peroxidación lipídica, incluyendo el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y el malondialdehído (MDA), en la corteza e hipocampo de pacientes con EA, en la sustancia nigra de pacientes con EP y en el líquido cerebro-espinal de pacientes con ELA (Butterfield y cols., 2002; Dexter y cols., 1989; Pedersen y cols., 1998). Además, se ha demostrado un incremento de la nitración de proteínas, un marcador de oxidación proteica, en hipocampo y neocorteza de individuos con EA, en los cuerpos de Lewy en casos de EP, y en las neuronas motoras de pacientes de ELA (Aoyama y cols., 2000; Good y cols., 1998; Smith y cols., 1997).

Las enzimas antioxidantes; superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GSHPx) y glutatión reductasa (GSHRd), aparecen con actividad reducida en las regiones del cerebro afectadas en la EA (Pappolla y cols., 1992; Zemlan y cols., 1989). La EP se caracteriza por una reducción de los agentes reductores del grupo tiol (glutatión; GSH) en las neuronas dopaminérgicas (Pearce y cols., 1997; Perry y cols., 1982; Perry and Yong, 1986). La depleción de GSH es el indicador bioquímico más temprano conocido de degeneración nigral en la EP, y la magnitud de la depleción va en paralelo con la severidad de la enfermedad.

En resumen, el estrés oxidativo (EO) está asociado consistentemente con las patologías neurodegenerativas.

La proclama fisiológica general “la muerte es la condición esencial de la vida” posee una carrera más firme en biología, ya que la muerte celular programada (Apoptosis) es obligatoria para el desarrollo normal de los organismos multicelulares (Jacobson y cols., 1997). Pero la apoptosis es un arma de doble filo, ya que la muerte celular desorganizada está implicada en un gran número de desordenes clínicos (Thompson, 1995). Así, los procesos apoptóticos necesitan estar perfectamente regulados.

Se conocen tres compartimentos celulares implicados en la activación tanto de la supervivencia como de la muerte: la membrana plasmática (MP), la mitocondria y el retículo endoplásmico (RE). En la MP se localizan receptores tanto de muerte como de supervivencia, y en la mitocondria residen también algunas de las proteínas que regulan la apoptosis. En el RE, tercer compartimento implicado en la ejecución de la apoptosis (Nakagawa y cols., 2000; Yuan y Yankner, 2000), es donde se produce la síntesis y procesamiento de las proteínas secretadas y es el almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Primero, miembros de la familia de las proteínas Bcl2, pro- y antiapoptóticas, están localizados en membranas intracelulares tales como la envuelta nuclear, la membrana externa mitocondrial y el RE (Krajewski y cols., 1993). Y segundo, el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ha sido implicado como segundo mensajero pro-apoptótico; tanto en la regulación de las enzimas específicas de muerte como en la activación de la apoptosis (Berridge y cols., 1998; Lin y cols., 2004; Matzno y cols., 2006).

De estas enzimas específicas de muerte, las más importantes son una familia de cistein-proteasas específicas de aspartato conocidas como caspasas (Zheng y cols., 1999). Estas enzimas pueden ser divididas en dos grupos: las caspasas iniciadoras (como la caspasa 8 y 9) que activan a las otras caspasas *downstream*, y las caspasas ejecutoras (como las caspasas 3, 6 y 7), responsables de hacer efectivo el proceso de apoptosis.

## 1.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO.

Como consecuencia del estrés oxidativo (EO) se produce el daño a moléculas (proteínas, lípidos y/o ácidos nucleicos), por la acción de radicales libres o de especies reactivas de oxígeno (ROS). “Especies reactivas” es el término que se aplica colectivamente a las moléculas químicas, radicales y no radicales, que son agentes oxidantes y/o que son fácilmente convertidos a radicales. La regulación en la generación de estas moléculas es importante para evitar patologías, así pues en tejidos lesionados, en la mayoría de las enfermedades humanas, puede darse una disminución de las defensas antioxidantes (p.e. por acción de un xenobiótico) o un incremento en la generación de especies reactivas (p.e. en presencia de toxinas que al metabolizarse generen especies reactivas) (Gutteridge y Mitchell, 1999; Halliwell, 1999). Algunas fuentes exógenas generadoras de especies reactivas de oxígeno en los organismos son antibióticos, medicamentos

(p.e. paracetamol), contaminantes (p.e. dióxido de nitrógeno, ozono, humo de cigarrillo), quimioterapia y exposición a radiación ultravioleta e ionizante (Finkel y Holbrook, 2000).

Fuentes endógenas de radicales libres son los metales de transición como cobre y hierro (Lewen y cols., 2000; Smith y cols., 1997). Además, ROS podría originarse durante el metabolismo celular, como en la fosforilación oxidativa dentro de la mitocondria (Hayes y McLellan, 1999; Hayes y Strange, 1995; Richter, 1995).

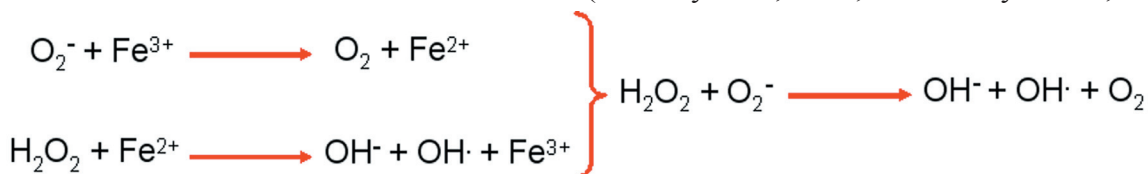
En la respiración celular el oxígeno no oxida directamente a los sustratos, sino que de éstos se separan electrones, que reducen al oxígeno molecular. En el proceso intervienen las coenzimas transportadoras de electrones (Repetto, 1997). Para reducir una molécula de  $O_2$  se precisan 4 electrones; cuando no se dispone de ellos, o la reacción no es total, se pueden formar derivados del oxígeno de gran reactividad (oxígeno activado, reducido).

En la mitocondria se estima que del 2-4% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones no se reduce a agua por la citocromo C oxidasa sino que se forma el anión semiquinona el cual puede transferir uno o dos electrones al oxígeno molecular con la posterior formación del anión superóxido ( $O_2^-$ ). Este, a su vez puede generar otras especies reactivas de oxígeno que, en exceso, reaccionan con toda clase de macromoléculas, causando citotoxicidad y daño mutagénico (Dalton y cols., 1999; Finkel y Holbrook, 2000; Gutteridge y Mitchell, 1999).

El  $O_2^-$  es convertido a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) mediante la reacción de Fenton con complejos de bajo peso molecular de Fe(II), como el citrato Fe(II) o la ATPFe(II), generando radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ):



A su vez los iones de cobre pueden participar en reacciones de Fenton. La reducción y reciclaje de los iones hierro y cobre son catalizadas “in vivo” por el  $O_2^-$  y, la de  $H_2O_2$  es la reacción Haber-Weiss en la cual los iones metálicos actúan como catalizadores (Dalton y cols., 1999; Stadtman y Oliver, 1991).



Otras fuentes de  $O_2^-$  y de  $H_2O_2$  son las enzimas oxidativas, como la xantina oxidasa (fig.I.2), las NADPH/NADH oxidasas, la acil CoA oxidasa y los citocromos P-450, y pequeñas moléculas autooxidables como las cotecolaminas y las quinonas (Dalton y cols., 1999; Gamaley y Klyubin, 1999).

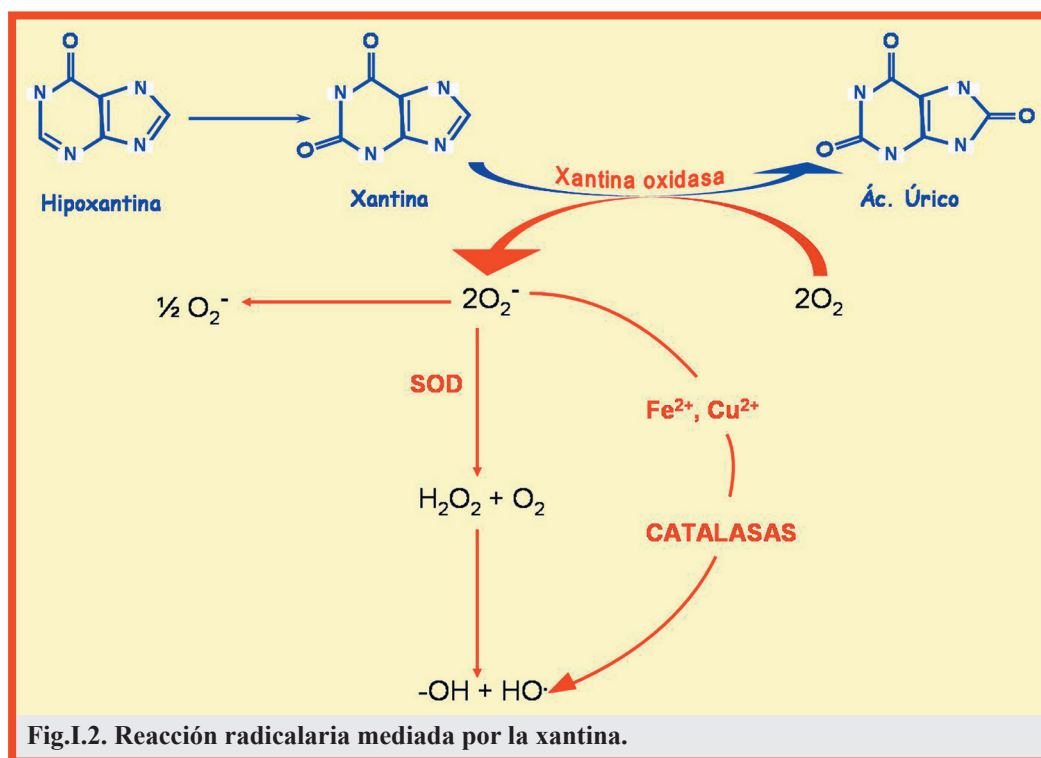
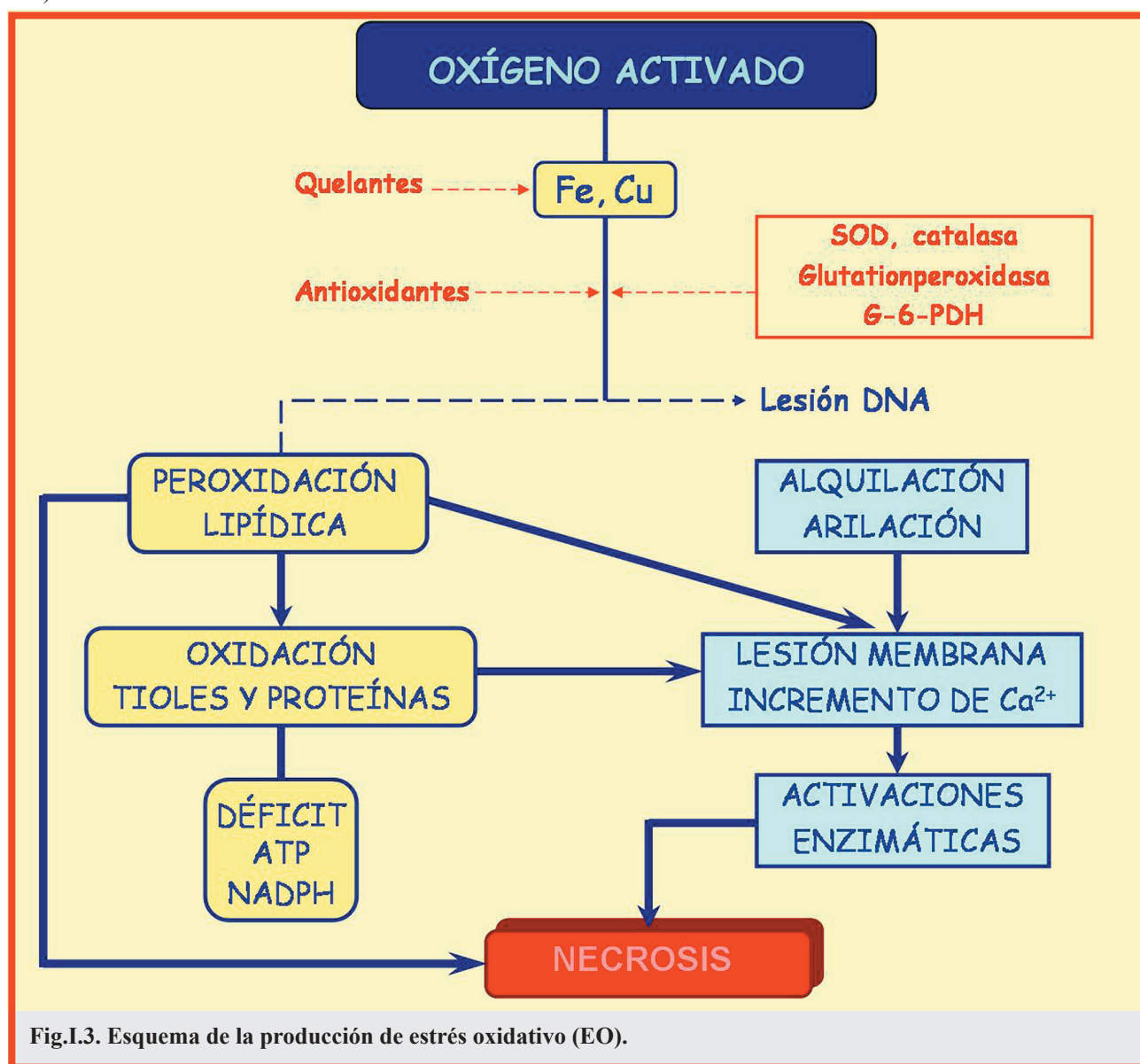


Fig.I.2. Reacción radicalaria mediada por la xantina.



El proceso fisiopatológico asociado a EO (fig. I.3) se puede desarrollar por los siguientes mecanismos:

1. El radical libre del producto primitivo puede alquilar a diferentes componentes tisulares (membranas celulares, retículo endoplásmico, enzimas, etc.), produciendo necrosis, o déficit metabólico o de defensa, o trastornos en la proliferación celular (cáncer) por alteración de los ácidos nucleicos (Repetto, 1997).
2. Las formas de “oxígeno activado” (fig. I.3) actúan preferentemente oxidando fuertemente los lípidos celulares (especialmente los lípidos insaturados) y también los compuestos con grupos SH (glutathion, etc.), iniciando lo que se conoce como estrés oxidativo (EO), que da lugar a procesos inflamatorios y citotóxicos. Precisamente, los fagocitos activados, en su función bactericida, liberan  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  (Repetto, 1997).



A gran escala, el EO resulta de la exposición de las células a ROS (Rushmore y cols., 1991). Los niveles de glutathion intracelular sirven como un tampón para los niveles de EO, con la forma reducida a 30:1 en exceso sobre la forma oxidada en el citosol (Richter y cols., 1995). Los niveles de glutathion decrecen gradualmente en condiciones de estrés y así, el nivel del glutathion intracelular se utiliza como una medida de estado redox.

La respuesta celular a ROS puede ser dividida en dos categorías: regulación basal e inducible. **La regulación basal** se refiere a la respuesta “housekeeping”, en respuesta a las ROS liberadas como productos metabólicos. En contraste, **la regulación inducible** ocurre en condiciones de estrés agudo, así como, en el *intake* de componentes tóxicos o cuando falla la regulación basal. Un grupo de genes similares es inducido por una variedad de ataques oxidativos y, en algunos casos, estos genes contienen elementos de

respuesta antioxidante (ERAs; 5'(G/A)TGA(G/C)nnnCG(G/A)3') en sus regiones promotoras (Rushmore y cols., 1991). Estos genes codifican para proteínas que funcionan como antioxidantes y como enzimas implicadas en la biosíntesis del glutatión (Hayes y McLellan, 1999; Hayes y Strange, 1995; Rushmore y cols., 1991).

Una familia de factores de transcripción, los factores nucleares respiratorios (Nrf), regula la expresión de los genes que contienen secuencias ERA en condiciones normales y de estrés (Kobayashi y Tagawa, 1999; Venugopal y Jaiswal, 1996). La importancia de la detoxificación de ROS en condiciones patológicas ha centrado la atención en la ruta de señalización inducible por EO, la del factor de transcripción Nrf2 (Cullinan y Diehl, 2006).

### 1.2.1. Estrés oxidativo y calcio.

Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  son enviadas a través de canales que difieren en su localización celular y en su amplitud y duración de la respuesta (Davies y cols., 2001). Cualquier fallo en esta señal puede cambiar el “código de  $\text{Ca}^{2+}$ ” y modificar múltiples procesos biológicos. Los oxidantes pueden reaccionar con metabolitos celulares y elementos estructurales y modificar sus propiedades. Actualmente se considera que la alteración de las proteínas que regulan el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es el eslabón entre los mecanismos alquilantes o los oxidantes con la muerte celular (Orrenius y cols., 2003; Repetto, 1997).

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol regula diversas funciones celulares (fig. I.4). Esta concentración, que es extraordinariamente más baja que la de la matriz extracelular, es regulada por tres mecanismos: a) la entrada y salida de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula a través de la membrana plasmática, con intervención de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ ; b) el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del ER, donde el  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser almacenado, y c) la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias. En consecuencia, la peroxidación de lípidos de la membrana o la lesión de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática, en la mitocondria (déficit de ATP) o en el RE, puede aumentar considerablemente los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, por una mayor entrada a la célula o por su salida al citosol desde las vesículas del RE (Szlufcik y cols., 2006).

En una situación de EO, el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico activa a distintas enzimas proteasas y fosfolipasas que participan directamente en la muerte celular (fig. I.4). Los oxidantes pueden atacar directamente las membranas formando lípidos peroxidados que activan la fosfolipasa 2 (PLA2) (Davies y cols., 2001; Dykens, 1994). Este proceso puede involucrar a la proteína quinasa C (PKC) y al Inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3), este último actúa sobre los receptores del RE y causa la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado. En resumen, niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  elevados pueden activar a enzimas que producen radicales libres y los oxidantes, a su vez, pueden causar mayor producción de oxidantes e incrementar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ .



### 1.2.2. Estrés oxidativo y apoptosis.

El EO puede producir apoptosis por diferentes mecanismos (fig.I.5). La producción de ROS por la mitocondria incrementa la permeabilidad de la membrana, lo que da lugar a la liberación de citocromo c e inicio de la apoptosis (Mattson and Kroemer, 2003). Los radicales hidroxilo pueden atacar directamente a las bases de DNA y, si el daño es muy amplio, se activa una vía de muerte celular que implica a la quinasa ATM (ataxia-telangiectasia mutada), a p53 y a la traslocación de Bax a la mitocondria (Culmsee and Mattson, 2005).

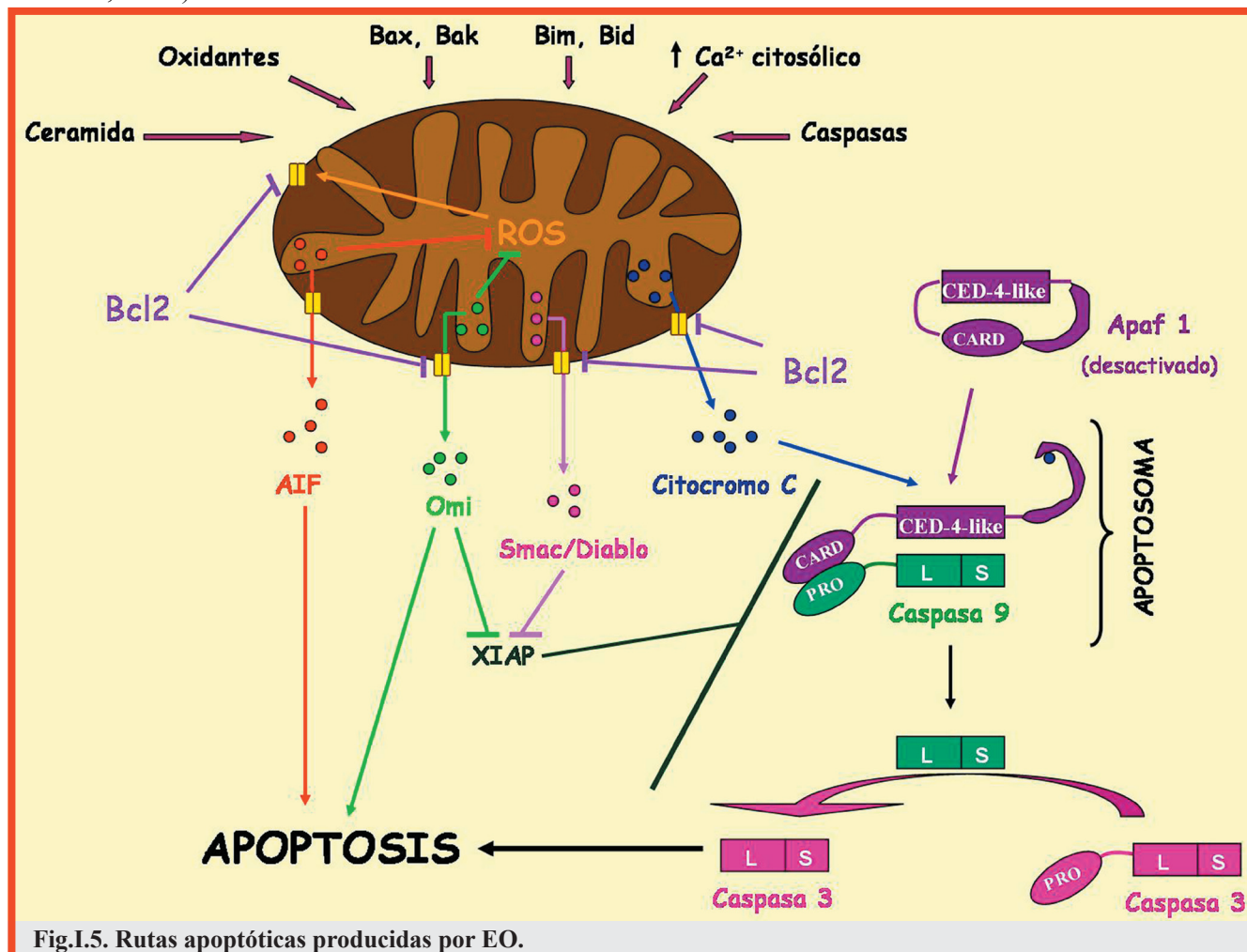


Fig.I.5. Rutas apoptóticas producidas por EO.

El EO asociado a membrana plasmática puede dirigir la apoptosis por diversos mecanismos; p.e. la peroxidación lipídica genera aldehído 4-hidroxinonenal, que puede inducir apoptosis por perturbación en las homeostasis iónicas e inducir la permeabilidad mitocondrial; este mecanismo podría mediar la muerte neuronal por privación de algún factor neurotrófico, como ocurre en EA y en ELA (Bruckner y cols., 2003; Kruman y cols., 1997; Pedersen y cols., 1998). El EO también activa esfingomielinasas, lo que conduce a la liberación de ceramidas de la esfingomielina de membrana; las ceramidas pueden producir la apoptosis por activación de quinasas y por la interacción con la membrana mitocondrial (Zhou y cols., 2000). La producción incrementada de ceramida ha sido ligada a muerte neuronal en EA, demencia asociada al HIV y en ELA (Cutler y cols., 2004; Cutler y cols., 2002; Haughey y cols., 2004).

La mitocondria es el productor de energía básico en la célula, ya que proporciona ATP para la mayoría de los procesos celulares. A parte de ser la planta de energía celular, la mitocondria, posee otras funciones adicionales en la fisiología celular. Estudios realizados durante la pasada década han demostrado que la mitocondria juega un papel decisivo en la apoptosis, controlando la liberación de citocromo c y otros factores proapoptóticos (Danial y Korsmeyer, 2004; Nicholson y Thornberry, 2003). Proteínas intracelulares específicas, presentes en diferentes tipos celulares, incluso en neuronas, participan en el control de la muerte celular programada (MCP). Entre estas proteínas, las caspasas son las moléculas efectoras *downstream* de la mitocondria (Nicholson y Thornberry, 2003), mientras que la familia de las proteínas Bcl2 actúan *upstream* o en asociación con la membrana mitocondrial (Adams y Cory, 1998;

Danial y Korsmeyer, 2004; Nicholson y Thornberry, 2003).

Los miembros de la familia de Bcl2 son reguladores clave en el control de la liberación de citocromo c y otros factores mitocondriales mediadores de apoptosis (Wang, 2001). La familia de proteínas de Bcl2 está dividida en dos grupos; antiapoptóticas y proapoptóticas. Dentro del grupo de las antiapoptóticas se incluyen Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, y dentro de las proapoptóticas se van a dividir en los de la clase BH3 solamente (incluyendo a Bid y Bim) y los de la clase multidominio (incluyendo a Bax y Bak). Bax y Bak están normalmente localizadas en el citosol y se traslocan a la mitocondria en respuesta a varios estímulos proapoptóticos (Roucou y Martinou, 2001). Una vez en la mitocondria promueven la formación del complejo de poro de transición de la permeabilidad (PTP) y la liberación de citocromo c y otros factores proapoptóticos de la mitocondria, mientras que, Bcl2 y Bcl-xL, previenen de este efecto (Adams y Cory, 1998; Danial y Korsmeyer, 2004; Martinou y Green, 2001; Shimizu y cols., 1999).

El citocromo c que es liberado de la mitocondria se liga a una proteasa que es un factor de activación de apoptosis (Apaf1), lo que resulta en la formación del apoptosoma, que contiene además procaspasa 9 y dATP. La caspasa 9 es entonces activada dirigiendo el procesamiento de caspasa 3 y otras caspasas en una cascada de amplificación causante de la muerte celular (Li y cols., 1997; Srinivasula y cols., 1998). Las caspasas 3 y 9 pueden ser bloqueadas por proteínas pertenecientes a los inhibidores de apoptosis (IAP), incluido el inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X (XIAP). Particularmente en neuronas, el paso final de la muerte parece requerir, después de la liberación de citocromo c, la función de alguna molécula que interfiera con la actividad de caspasas en la célula (Deshmukh y cols., 2002).

Smac/Diablo es una proteína proapoptótica que reside en el espacio intermembranal de la mitocondria y es liberado cuando se induce de la muerte celular. Smac/Diablo puede ligar e inhibir XIAP a través de su secuencia amino terminal AVPI y, además, promueve la activación de caspasas (Vaux y Silke, 2003). A parte de Smac/Diablo, otra proteína llamada Omi/HtrA2 (Omi) que es también liberada de la mitocondria, promueve la muerte celular y contiene la secuencia AVPS de ligación a XIAP (Hegde y cols., 2002; Verhagen y cols., 2002). Omi es una serinproteasa mitocondrial que pertenece a una extensa familia de genes que codifican para chaperonas con actividad proteasa HtrA (Li y cols., 2002). Las últimas investigaciones le dan a esta proteína una función dual en la regulación de la muerte inducida por la mitocondria. Por un lado, actuaría como una señal de supervivencia dentro de la mitocondria y, por otro lado, como una molécula proapoptótica cuando es liberada de la misma. Esta dicotomía en la acción se parece a la del factor inductor de apoptosis (AIF) que es otra proteína encontrada en el espacio intermembranal de la mitocondria (Joza y cols., 2001). AIF es liberado de la mitocondria durante la muerte celular y translocado al núcleo para inducir la fragmentación del DNA, causando una ruta de muerte independiente de caspasas (Arnoult y cols., 2003).

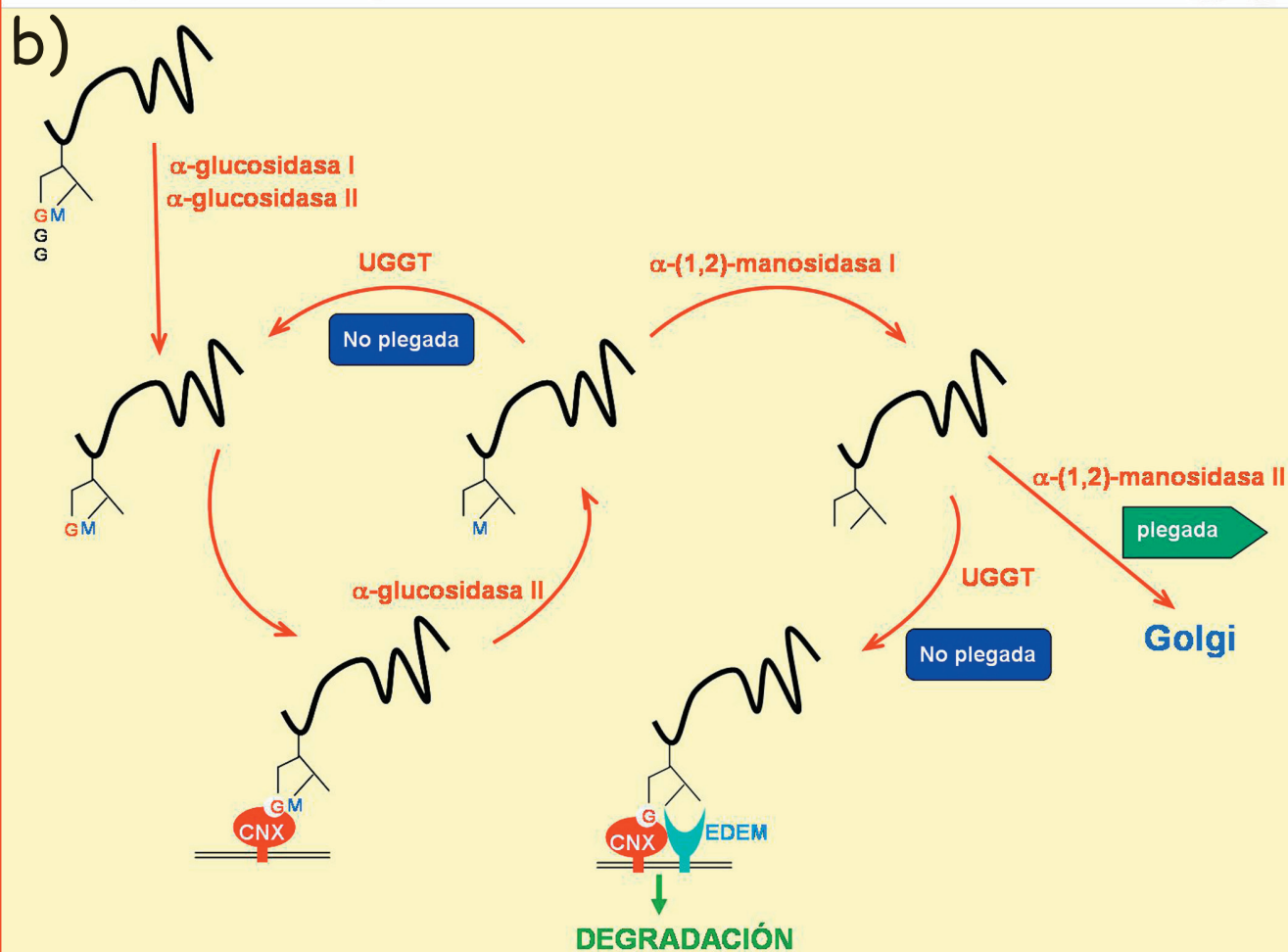
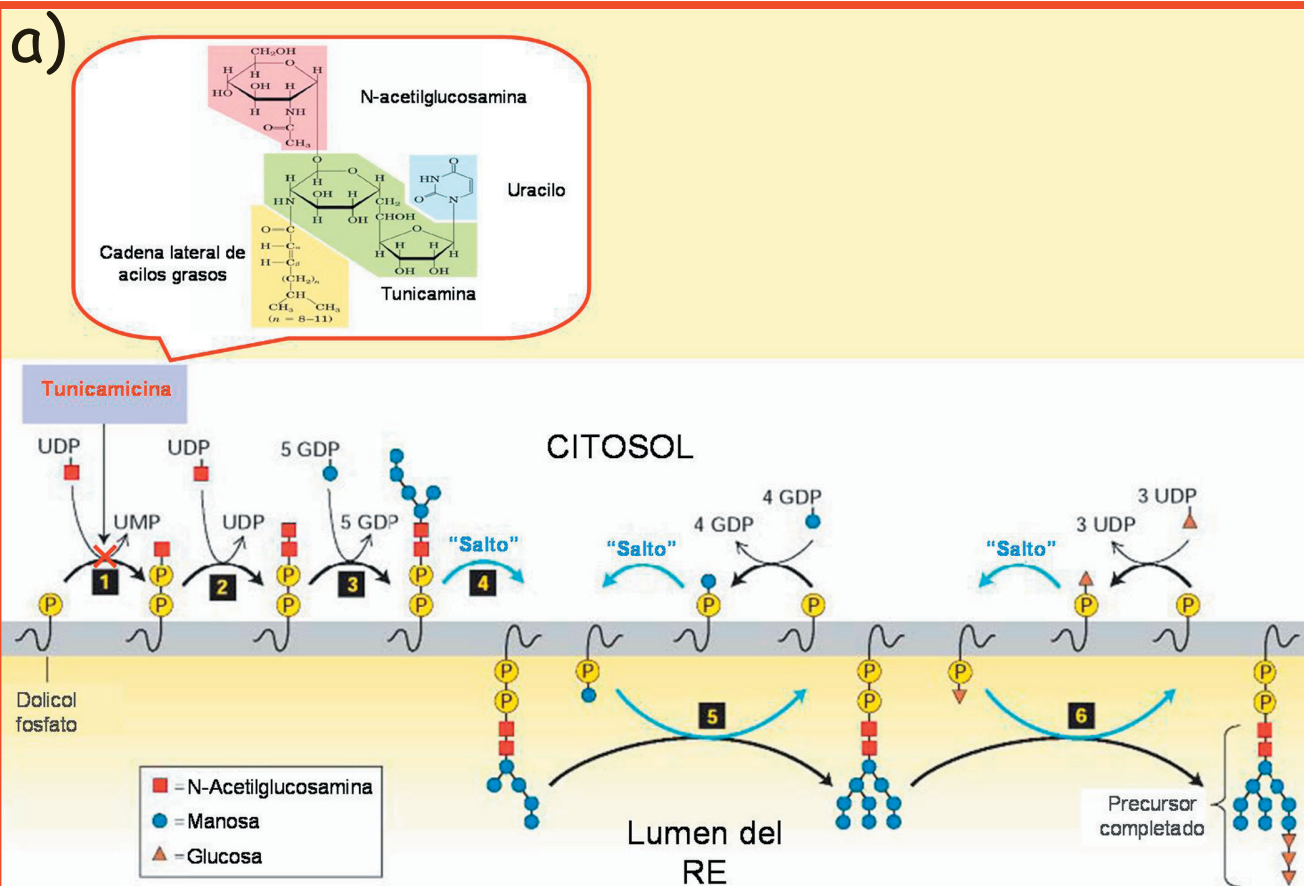
### 1.3. ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.

El estrés se puede definir como la respuesta de algún sistema a las perturbaciones producidas en su estado normal. Para aplicar esta definición de estrés a un orgánulo de la célula, p.e. el RE, nos hacemos la siguiente pregunta: ¿Cuáles son las funciones fisiológicas del RE y como están afectadas? Además, hay que comprender como se detectan las señales de estrés y como se inician las rutas que restauran el estado original.

En las células eucariotas, el RE es el compartimento principal en la vía secretora, siendo responsable de la síntesis, modificación y transporte de las proteínas a sus lugares diana dentro de esta ruta hacia el espacio extracelular. En el RE, las proteínas son plegadas para que alcancen su conformación nativa y, sufren una gran variedad de modificaciones post-traduccionales, incluyendo la glicosilación ligada a asparagina (fig.I.6.a) (Hubbard y Ivatt, 1981; Kornfeld y Kornfeld, 1985), y la formación de puentes disulfuro, tanto intra- como intermoleculares. A este proceso, que es estrictamente dependiente de Ca<sup>2+</sup>, se le denomina “control de calidad”, ya que sólo son exportadas al aparato de Golgi aquellas proteínas correctamente plegadas (fig.I.6.b).

Alteraciones en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> del RE (Mattson y cols., 2000) causan una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del mismo (Douthail y cols., 1999; High y cols., 2000; Mengesdorf y cols., 2001; Paschen, 2001), una situación que induce la activación de dos respuestas a estrés altamente





**Fig.1.6. Proceso de glicosilación de las proteínas en el retículo endoplásmico (RE).** a) Reacción de N-glicosilación que lleva a la formación del precursor proteico (Lodish y cols., 2004), se indica con una x roja el punto donde bloquea la tunicamicina (Tm) y recuadrado encima la fórmula de esta droga. b) Reacción de plegamiento que sufren las proteínas en el RE y los puntos de control de calidad (Shröder y Kaufman, 2005).

conservadas: la respuesta a sobrecarga del RE (EOR) y la respuesta a mal plegamiento de proteínas (UPR). La UPR consiste en restaurar la capacidad de plegamiento del RE y en deshacerse de las proteínas malplegadas para así retornar al RE a sus niveles fisiológicos normales. Para ello se emplean dos sencillos mecanismos adaptativos: 1) la propia regulación de la capacidad de plegamiento a través de la inducción de chaperonas moleculares y plegasas del RE (Schroder y Kaufman, 2005b; Shen y cols., 2004), y 2) la regulación de la vía biosintética del RE a través de la inhibición de la síntesis de las proteínas a nivel de la transcripción (Martinez y Chrispeels, 2003; Pakula y cols., 2003) y de la traducción (Harding y cols., 1999).

### 1.3.1. Respuesta a mal plegamiento de proteínas.

El plegamiento de proteínas requiere de una compleja maquinaria formada por proteínas residentes en el RE. Cuando se supera la capacidad de esta maquinaria por sobreexpresión de proteínas salvajes, p.e. el factor VIII de coagulación sanguínea (Kaufman y cols., 1988) o la antitrombina III (Schroder y cols., 2002), se produce la acumulación de proteínas mal plegadas y agregadas en el RE y, por tanto, la activación de la respuesta UPR (fig.I.7).

El mal plegamiento ocurre en el RE no solamente cuando las acumulaciones de nuevas proteínas secretoras o transmembranales sintetizadas excedan la capacidad de plegamiento del RE, sino también cuando el proceso productor del plegamiento falla por el desarrollo de condiciones de estrés. Además, proteínas que poseen mutaciones genéticas en sus secuencias de aminoácidos podrían no ser plegadas apropiadamente y, en respuesta a la acumulación de estas proteínas malplegadas en el RE, se dispara la respuesta homeostática, UPR, en todas las células eucariotas (High y cols., 2000; Schroder y Kaufman, 2005b; Shen y cols., 2004). Esta respuesta a estrés es iniciada por tres tipos de transductores, localizados en la membrana del RE: el factor activador de la transcripción 6 (ATF6), la proteína que requiere inositol 1 (IRE1) y la quinasa PKR (proteína quinasa activadora del RNA de doble cadena) relacionada con el RE (PERK).

**I. ATF6:** La capacidad del ER está totalmente controlada por la inducción de una serie de moléculas residentes en él, incluidas las chaperonas Grp78/Bip y Grp94 (Gething y Sambrook, 1992), enzimas como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) (Dorner y cols., 1990) y la peptidil-prolilisomerasa, así como proteínas relacionadas con la degradación asociada al RE (ERAD) como la proteína  $\alpha$ -manosidasa activadora de la degradación (EDEEM) (Hosokawa y cols., 2001). Estas proteínas son inducidas a nivel transcripcional en el proceso de respuesta a malplegamiento de proteínas (UPR).

La UPR está controlada por dos secuencias consenso distintas en la región promotora de los genes diana que son específicas de ERE: una es el elemento de respuesta a ERE que actúa en cis (ERSE) y la otra es el elemento de respuesta a malplegamiento de proteínas (UPRE). Estas secuencias son activadas por factores de transcripción que contienen dedos de leucina básicos (bZIP), ATF6 (Yoshida y cols., 1998) y la proteína ligada a la caja X 1 (XBP1) (Shen y cols., 2001; Yoshida y cols., 2001) (fig.I.7.a).

Se conocen dos formas de ATF6, p90ATF6 y p110ATF6, las cuales se sintetizan como proteínas transmembranales de RE tipo II. En respuesta a ERE, el ATF6, es traslocado del RE al Golgi (Bertolotti y cols., 2000; Chen y cols., 2002), donde es procesado por las proteasas del sitio 1 (S1P) y del sitio 2 (S2P) cerca de la región transmembranal para generar un dominio citosólico N-t, p50ATF6, el cual contiene un dominio bZIP. P50ATF6 entonces se trasloca al núcleo y se liga a ERSE con el factor de transcripción NF- $\gamma$ , lo que da como resultado la inducción de los genes diana de UPR tales como Grp78/BIP y XBP1 (Haze y cols., 1999; Li y cols., 2000; Yoshida y cols., 2000).

**II. IRE-1:** es una serin-treonin quinasa que también tiene un sitio de actividad endoribonucleasa (RNasa) (Tirasophon y cols., 1998; Wang y cols., 1998a). Hay dos formas de IRE1 en mamíferos, IRE1 $\alpha$  ubicuamente expresada, e IRE1 $\beta$  expresado solamente en células del epitelio intestinal (Urano y cols., 2000b). La activación de IRE1 está dirigida por la disociación de Grp78/Bip de su dominio luminal; IRE1 entonces dimeriza, se autofosforila, y es completamente activado (fig.I.7.b).

En respuesta a estrés de RE (ERE), el ARNm de XBP1 es cortado por IRE1 para eliminar un

intrón de 26nt y generar una pauta de lectura de traducción (Calfon y cols., 2002; Shen y cols., 2001; Yoshida y cols., 2001). La forma procesada de XBP1 se une directamente a la secuencia ERSE con NF- $\gamma$  y tiene una alta actividad transcripcional en la regulación positiva de los genes diana de UPR. La delección de IRE1 $\alpha$  causa letalidad a embriones de 10,5 días (Lee y cols., 2002; Urano y cols., 2000a; Urano y cols., 2000b). La delección de XBP1 también produce letalidad embrionaria (Masaki y cols., 1999), consistente con la idea de que XBP1 actúa *downstream* de IRE1.

Ire1 es el sensor proximal de estrés del lumen del ER y, esta vía, va a dar lugar a la activación de la expresión de los genes que codifican para dos factores que inducen muerte celular programada: la proteína marcadora del RE de 72 KDa (erp72) y la proteína homóloga a C/EBP (CHOP); y la expresión de los genes que codifican para diversas chaperonas moleculares, que están implicadas en traslocación, plegamiento y ensamblaje de proteínas, así como en la regulación de la secreción. Una de estas chaperonas es una proteína de 150 KDa reguladora del oxígeno, ORP150, que puede ser inducida por isquemia, hipoxia, inhibición de la N-glicosilación (Kaneda y cols., 2000) y por aminoácidos excitatorios (Kitao y cols., 2001); otras de esas chaperonas activadas son Grp94/Gp96 y Grp78/BiP. Estas últimas pueden ser inducidas bajo una variedad de condiciones de estrés incluyendo tratamientos con drogas que inhiben la N-glicosilación de proteínas (p.e. tunicamicina), hipoxia y, además, por variación de la temperatura de cultivo (Schweizer y cols., 1990) o por estrés oxidativo (Abraham, 1997; Shinohara y cols., 2006). Esta inducción es requerida para aliviar el estrés y mantener la función del ER, facilitar el plegamiento de proteínas y proteger a las células de ataques tóxicos.

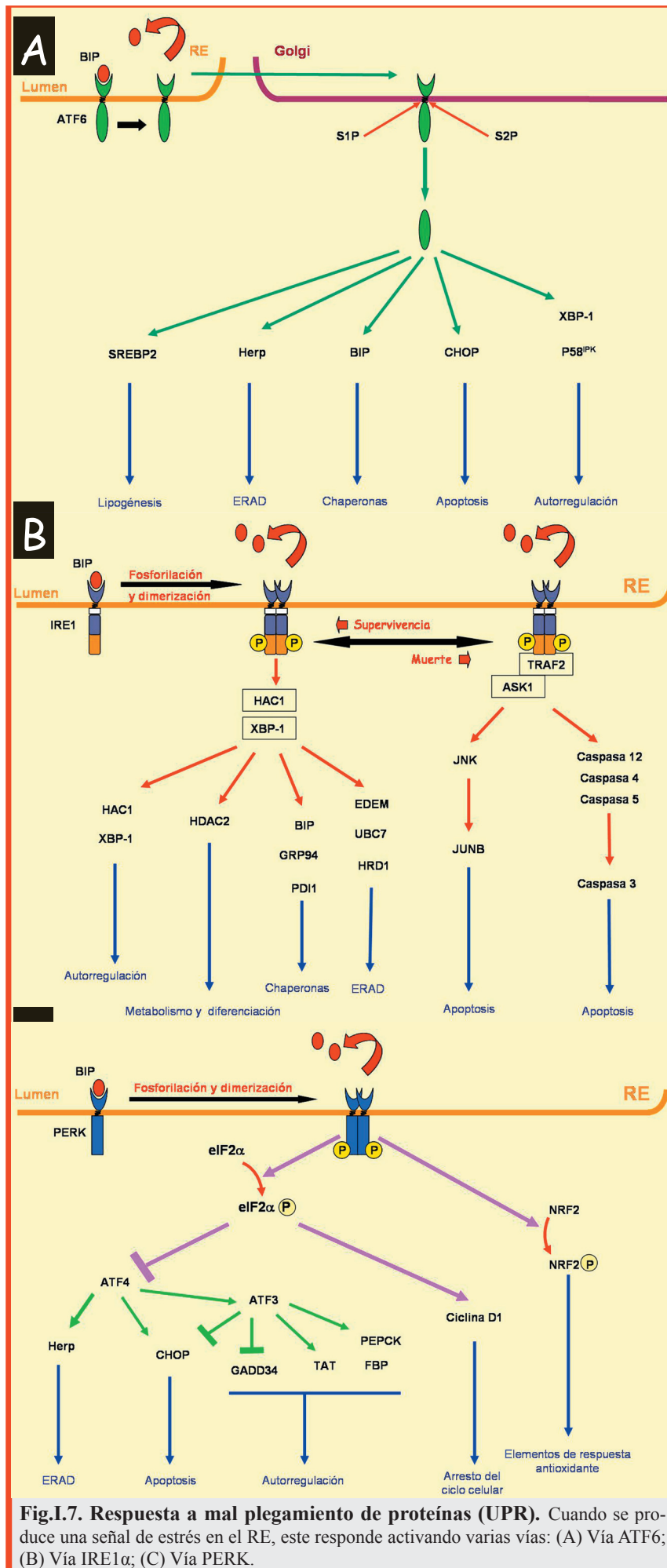
El papel de Grp78 y Grp94 en muerte neuronal es desconocido, las células normalmente responden al estrés en el ER con un incremento en la transcripción de los genes que codifican a Grp78, Grp94 y a una proteína isomerasa disulfatada (PDI) para facilitar el plegamiento de las proteínas (Mengesdorf y cols., 2001). Los niveles de Grp78 están marcadamente incrementados en respuesta a daño y/o axotomía cerebral, y varios estudios en células no neuronales (Rao y cols., 2002) sugieren, que Grp78 podría tener una función como supresor de apoptosis, porque bloquearía la activación de caspasas.

Las mutaciones en PS1 (EA familiar) llevan a una disminución de la expresión de Grp78, y, curiosamente, los niveles de Grp78 y Grp94 (Katayama y cols., 1999; Reddy y cols., 1999) están reducidos en cerebros de pacientes con Alzheimer, tal y como se menciona en el apartado 1.2 de esta introducción. Además, se ha descrito que la sobreexpresión de Grp78 en células de neuroblastoma con PS1 mutado restaura casi completamente la resistencia a estrés del ER hasta los niveles de células con expresión salvaje de PS1 (Katayama y cols., 1999), lo que demuestra que las mutaciones en PS1 pueden incrementar la vulnerabilidad a estrés de ER por alteración de la ruta de señalización de UPR.

**III. PERK:** es una serin-treonin quinasa transmembranal tipo I residente en el ER, que reconoce la acumulación de proteínas malplegadas. Como la de IRE1, la activación de PERK es también dirigida por la disociación de BIP del dominio luminal de PERK, seguido por oligomerización, y transautofosforilación (fig.I.7.c) (Bertolotti y cols., 2000). El PERK activo fosforila la serina 51 de la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la traducción 2 (eIF2 $\alpha$ ) y este produce la atenuación traduccional (Harding y cols., 1999). En células PERK $^{-/-}$ , la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y la atenuación traduccional en respuesta a estrés de ER está completamente inhibida, y las células mutantes para PERK se muestran hipersensibles y perjudicadas en su habilidad para sobrevivir en respuesta a estrés de ER (Harding y cols., 1999).

La ruta de supervivencia mediada por PERK no está promovida solamente por la atenuación de la traducción vía fosforilación de eIF2 $\alpha$  sino también, por la inducción de la transcripción de los genes diana de la UPR (Scheuner y cols., 2001). Las células PERK $^{-/-}$  y las células mutantes para eIF2 $\alpha$  en la serina 51 (eIF2 $\alpha$ S51A/S51A) tienen defectos severos en la activación de los genes diana de la UPR (Harding y cols., 2000; Scheuner y cols., 2001). La expresión de algunos genes diana de esta ruta, como son CHOP (también conocida como GADD153, un miembro de la familia C/EBP de los factores de transcripción bZIP) y del gen inductor de daño al DNA y parada del ciclo 34 (GADD34) es inhibida casi totalmente cuando se producen mutaciones en la ruta de señalización PERK-eIF2 $\alpha$  (Harding y cols., 2000; Novoa y cols., 2001; Scheuner y cols., 2001).

Se ha propuesto un potencial mecanismo para los genes inducidos por PERK, que consiste en



**Fig.I.7. Respuesta a mal plegamiento de proteínas (UPR).** Cuando se produce una señal de estrés en el RE, este responde activando varias vías: (A) Vía ATF6; (B) Vía IRE1α; (C) Vía PERK.



la activación traduccional dependiente de PERK del factor activador de la transcripción 4 (ATF4). La fosforilación de eIF2 $\alpha$  inducida por PERK induce además la expresión específica de la proteína ATF4 bajo condiciones de ERE. La proteína ATF4 es también inducida por otros estreses, incluyendo estrés oxidativo y privación de aminoácidos, este último activa otra quinasa de la eIF2 $\alpha$ , la GCN2 (Harding y cols., 2000).

El primer efecto de la señalización vía PERK es la reducción en la síntesis de proteínas nuevas dentro del ER cuando el proceso de plegamiento no es efectivo, todo ello pone de manifiesto la importancia de la regulación de la traducción para la supervivencia celular bajo condiciones de ERE. Sin embargo, paradójicamente, la atenuación traduccional induce la transcripción de ciertos mRNA, tales como la proteína CHOP/GADD153 (Ma y Taylor, 2002; Oyadomari y cols., 2002). Así pues, la ruta de PERK también juega un papel en la regulación transcripcional durante la respuesta UPR.

### 1.3.2. Respuesta a sobrecarga en el retículo endoplásmico.

EOR va a dirigir la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B; este, a su vez, activa la transcripción de genes diana que codifican para proteínas proinflamatorias tales como interferones, citoquinas y moléculas de adhesión, siendo así una ruta de muerte celular programada (Pahl y Baeuerle, 1996).

El RE va a generar dos segundos mensajeros en respuesta a estrés: calcio y ROS. La sobreexpresión o la alteración de las proteínas puede alterar la membrana del ER y producir la filtración de Ca<sup>2+</sup> o glutation (Imaizumi y cols., 2001). Algunas oxidasas localizadas en la membrana del ER (ciclooxigenasas, lipooxigenasas, citocromo P450, etc.) producen ROS como un producto secundario de su actividad peroxidasa y, se ha sugerido, que esta actividad peroxidasa es importante para la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Pahl y Baeuerle, 1996).

NF- $\kappa$ B es un heterodímero presente en el citoplasma que forma un complejo inactivo con I $\kappa$ B, el inhibidor de NF- $\kappa$ B. La exposición de células a varios inductores de estrés, activa la fosforilación de los residuos de serina 32 y 36 del amino terminal de I $\kappa$ B (Chen y cols., 1996). I $\kappa$ B fosforilado es reconocido para su ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S, liberando el heterodímero NF- $\kappa$ B que pasa al núcleo y activa los genes diana. Se han identificado dos kinasas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , que heterodimerizan y junto con NF- $\kappa$ B-inductor de kinasas (NIK) forman un complejo de alto peso molecular (700-900 KDa). Estas kinasas forman una cascada que es requerida para la fosforilación de I $\kappa$ B y su posterior degradación.

El sensor de estrés del RE, IRE1 $\alpha$ , es requerido para la activación de NF- $\kappa$ B en células tratadas con tapsigargina o tunicamicina (Ping y cols., 2006). En respuesta a ERE, IRE1 $\alpha$  forma un complejo con la quinasa inhibidora de  $\kappa$ B (IKK) a través del factor 2 asociado al receptor TNF (TRAF2). La inhibición de NF- $\kappa$ B suprime la muerte celular inducida por ERE en una línea celular de cancer de mama (MCF-7) (Lin y cols., 2004).

### 1.3.3. Estrés de retículo endoplásmico y Ca<sup>2+</sup>.

Se sabe que las proteínas de membrana y secretadas, son plegadas y procesadas en el ER, mediante reacciones que son estrictamente dependientes de Ca<sup>2+</sup> (Mori, 2000; Nakagawa y cols., 2000). Un bloqueo en la liberación de Ca<sup>2+</sup> del RE causa una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del mismo (Doutheil y cols., 1999). De la misma manera, inhibidores de la N-glicosilación como la tunicamicina (fig. I.6.a) o inhibidores del transporte de proteínas del ER al Golgi van a provocar estrés por acumulación de las proteínas (Schroder y Kaufman, 2005a; Shen y cols., 2004).

El ER es uno de los reguladores más importantes del Ca<sup>2+</sup> intracelular, teniendo en cuenta que las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> en el lumen del mismo (5 mM) son, en varios órdenes de magnitud, más altas que en el citosol (0,1  $\mu$ M) (Orrenius y cols., 2003). Además, las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> del RE fluctúan rápida y frecuentemente, ya que el Ca<sup>2+</sup> almacenado se moviliza durante la señalización celular (Webb y Miller, 2003). La entrada del Ca<sup>2+</sup> en el RE está regulada a través de la bomba ATPasa sarcoplásmica/ER (SERCA); y la liberación del mismo, vía el receptor inositol 1,4,5-trifosfato (InsP<sub>3</sub>R) o por los canales de Ca<sup>2+</sup> mediados por rianodina (RyR) (Mattson y cols., 2000).

La importancia de la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE en muerte neuronal ha sido demostrada (Paschen, 2000); un masivo incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es neurotóxico (Mattson y cols., 1993), y mutaciones en el gen de la presenilina-1 (PS-1) aumentan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE mediada por  $\text{InsP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$  (Fig. I.8) (Chan y cols., 2000). El péptido  $\text{A}\beta$ , uno de los componentes mayoritarios en las placas seniles de la EA, dirige la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE e induce neurotoxicidad y ERE (Suen y cols., 2003). Alteraciones en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE pueden también contribuir a isquemia cerebral, a través de la calpaina, cistein-proteasa y potencial mediador de apoptosis, que está activado en neuronas expuestas a hipoxia y reoxigenación (Bando y cols., 2003). Estos trabajos sugieren que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE induce ERE, siendo este un mecanismo importante para la neurotoxicidad de los desordenes neurodegenerativos severos.

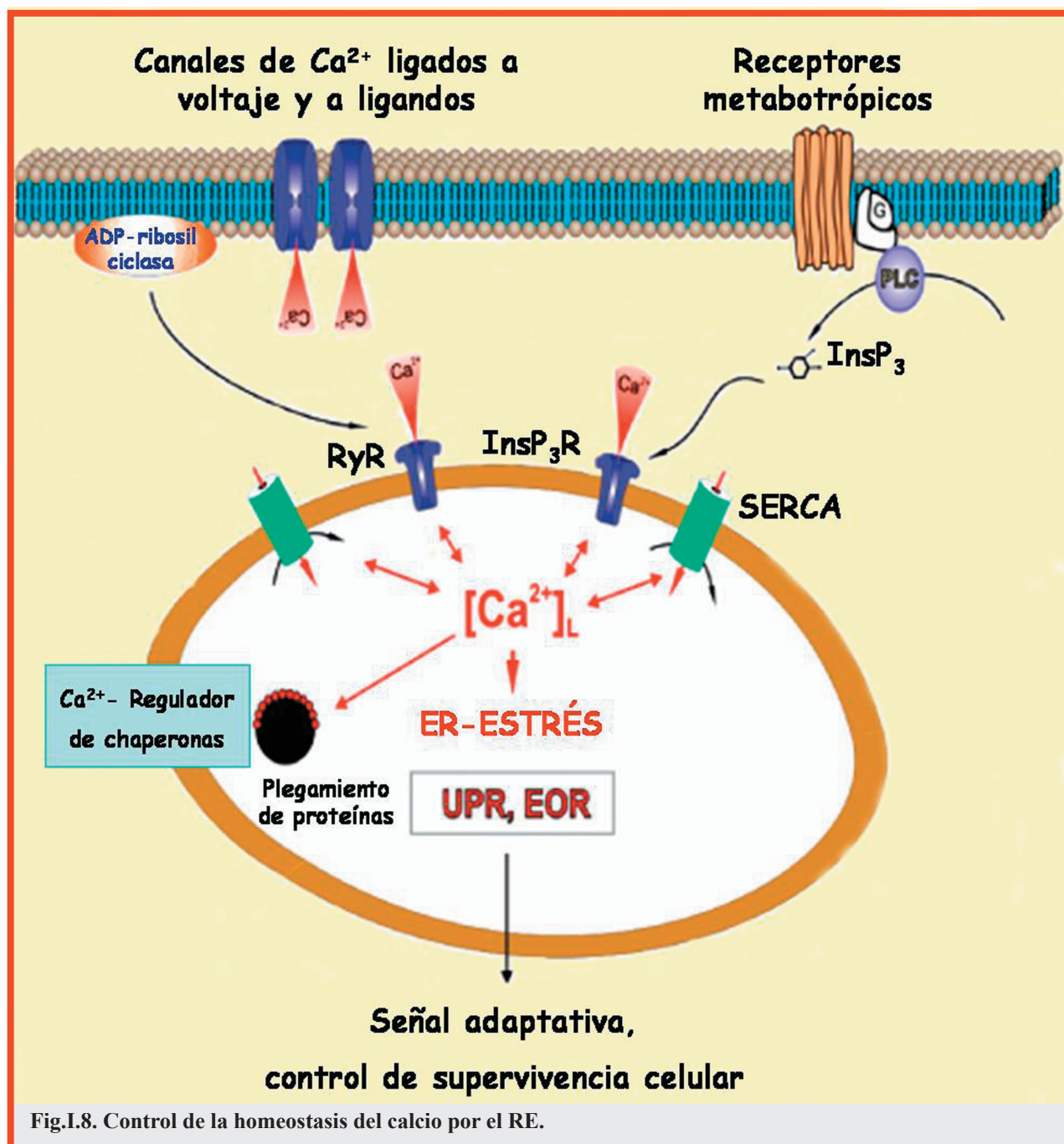


Fig.I.8. Control de la homeostasis del calcio por el RE.

Cuando se produce la señal de estrés, hay una movilización del calcio intracelular que provoca un incremento del calcio citosólico y desencadena tanto la respuesta UPR como la respuesta EOR. Este incremento en el calcio citosólico también afecta a la mitocondria, que va a producir ROS favoreciendo así la activación de la respuesta EOR (vía NFkB).

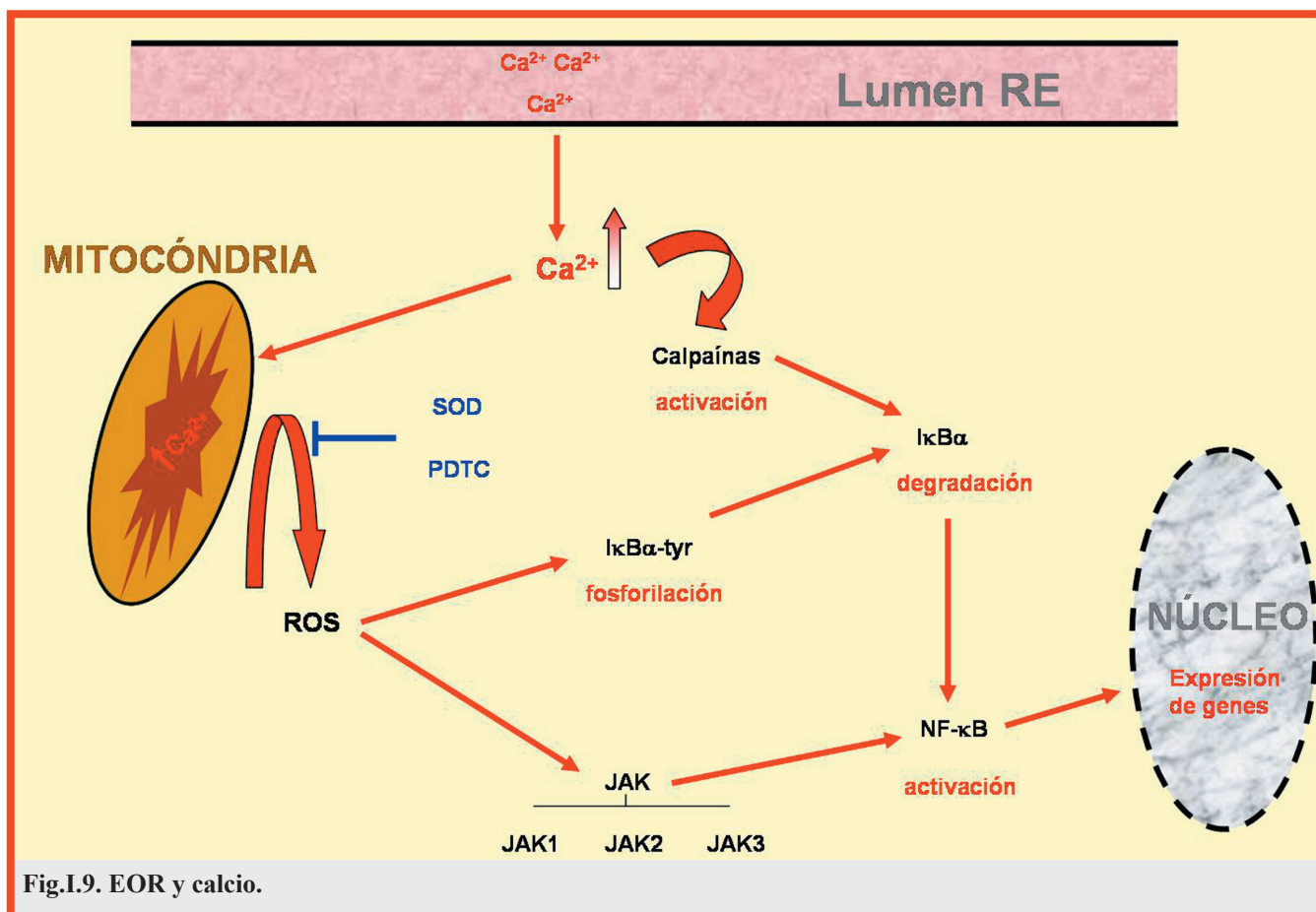


Fig.I.9. EOR y calcio.

### 1.3.4. Estrés de retículo endoplásmico y apoptosis.

CHOP/GADD153 fue la primera molécula que se descubrió que estaba implicada en la apoptosis inducida por ERE (Wang y cols., 1996). La sobreexpresión de CHOP produce parada del ciclo celular y/o apoptosis (Barone y cols., 1994; Friedman, 1996), y deficiencias en su expresión pueden proteger a las células de la apoptosis inducida por ERE (Oyadomari y cols., 2002; Walter y cols., 1996; Zinszner y cols., 1998). Así pues, CHOP juega un papel importante en la inducción de apoptosis. De la misma manera que para las chaperonas del ER (p.e. Bip), la activación de IRE1, PERK o ATF6 (fig.I.9) conduce a la activación transcripcional de CHOP (Gotoh y cols., 2002; Harding y cols., 2000; Wang y cols., 1998b; Yoshida y cols., 2000) (Ron, 2002). CHOP, a su vez, regula la expresión de una serie de genes, tales como la familia Bcl2 (Ron y Habener, 1992; Wang y cols., 1998b).

La caspasa 12 ha sido identificada como una molécula que inicia apoptosis selectivamente en respuesta a ERE. Está localizada en la membrana del ER, pero si es activada por ERE, pasa al citoplasma. Los estudios realizados con ratones deficientes en caspasa 12 demostraron que era imprescindible para producir apoptosis inducida por ERE (Nakagawa y cols., 2000). Se han propuestos diferentes mecanismos para la activación de la caspasa 12 (fig.I.9), uno de ellos ha demostrado que la procaspasa 12 se activa en respuesta a m-calpaina después de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (Nakagawa y Yuan, 2000). Otro mecanismo ha descrito la activación de la caspasa 12 por medio de calpaina, inducida por el péptido A $\beta$ , demostrando además que las neuronas caspasa 12  $-/-$  son parcialmente resistentes a la muerte celular inducida por A $\beta$  (Nakagawa y Yuan, 2000; Nakagawa y cols., 2000). Sin embargo, al contrario que en el ratón, el ortólogo humano de caspasa 12 no parece funcional (Fischer y cols., 2002). El gen de la caspasa 12 humana posee nueve transcritos de procesamiento, pero con una mutación de cambio de estructura y un codón de parada prematuro que están presentes en todas las variantes de procesamiento, lo que impide la expresión de la proteína completa.

En lugar de la caspasa 12, otras caspasas pueden estar jugando su papel en la muerte celular mediada por ERE en células humanas. Las candidatas son la caspasa 4 y la caspasa 5, ya que ambas poseen un dominio N-terminal CARD y muestran una alta similitud con la caspasa 12 de ratón (la secuencia de aminoácidos de la procaspasa 4 y de la procaspasa 5 presentan una similitud del 48 y del



45% respectivamente, con la procaspasa 12) (Faucheu y cols., 1995; Kamens y cols., 1995; Munday y cols., 1995). Además, el tetrapéptido que está cerca del sitio de fragmentación de la caspasa 12 (VETD) es similar al de la caspasa 4 humana (VEKD). Recientemente se ha demostrado que la caspasa 4 está localizada en el RE y es activada por ERE (Hitomi y cols., 2004).

Se ha demostrado que la familia de proteínas Bcl-2 existen tanto en el RE como en la mitocondria (Ferri y Kroemer, 2001). En MEFs de ratones doble knockout para Bax<sup>-/-</sup> y Bak<sup>-/-</sup> (Wei y cols., 2001) se ha descrito la resistencia a ERE y además, otro trabajo reciente, ha demostrado que Bax y Bak operan en el retículo como una puerta de entrada esencial en la apoptosis inducida por ERE (Scorrano y cols., 2003). Así pues, Bax y Bak serían llaves moleculares de la apoptosis inducida por ERE.

La ruta de la quinasa del amino terminal de c-Jun (JNK) también conocida como proteína quinasa inductora de estrés/SAPK (Urano y cols., 2000b), es activada por ERE a través de la interacción del factor 2 asociado al receptor TNF (TRAF2) con el dominio citosólico de quinasas de IRE1 (fig.I.9). La quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1 (ASK1) es requerida para la activación de JNK dependiente de TRAF2 en la ruta de señalización del factor de necrosis tumoral (TNF) (Nishitoh y cols., 1998; Urano y cols., 2000b). ASK1 es una proteína quinasa quinasa quinasa activadora de mitógeno (MAPKKK), la cual activa ambas rutas JNK y p38 (Ichijo y cols., 1997). En células normales, ASK1 se asocia rápidamente con TRAF2 después de la estimulación de ERE y es activada; mientras que, en células ASK1<sup>-/-</sup> se inhibe la activación de JNK inducida por ERE y la apoptosis (Nishitoh y cols., 2002). La Bcl-2 es fosforilada e inactivada por la coexpresión de ASK1 y JNK (Yamamoto y cols., 1999), y por la sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo de ASK1 que induce la liberación de citocromo c de la mitocondria y activa caspasa-9 y -3. ASK1 falla en la inducción de caspasa-3 y apoptosis en células deficientes en caspasa-9 (Hatai y cols., 2000). Se han mostrado que Bim es inducida por la ruta JNK-c-Jun (Whitfield y cols., 2001), y la fosforilación de Bim por JNK (Putcha y cols., 2003) es importante para la muerte de neuronas simpáticas. Así, los miembros de la familia de Bcl-2 son fuertes candidatos como dianas “downstream” de la ruta ASK1-JNK en muerte neuronal inducida por ERE.

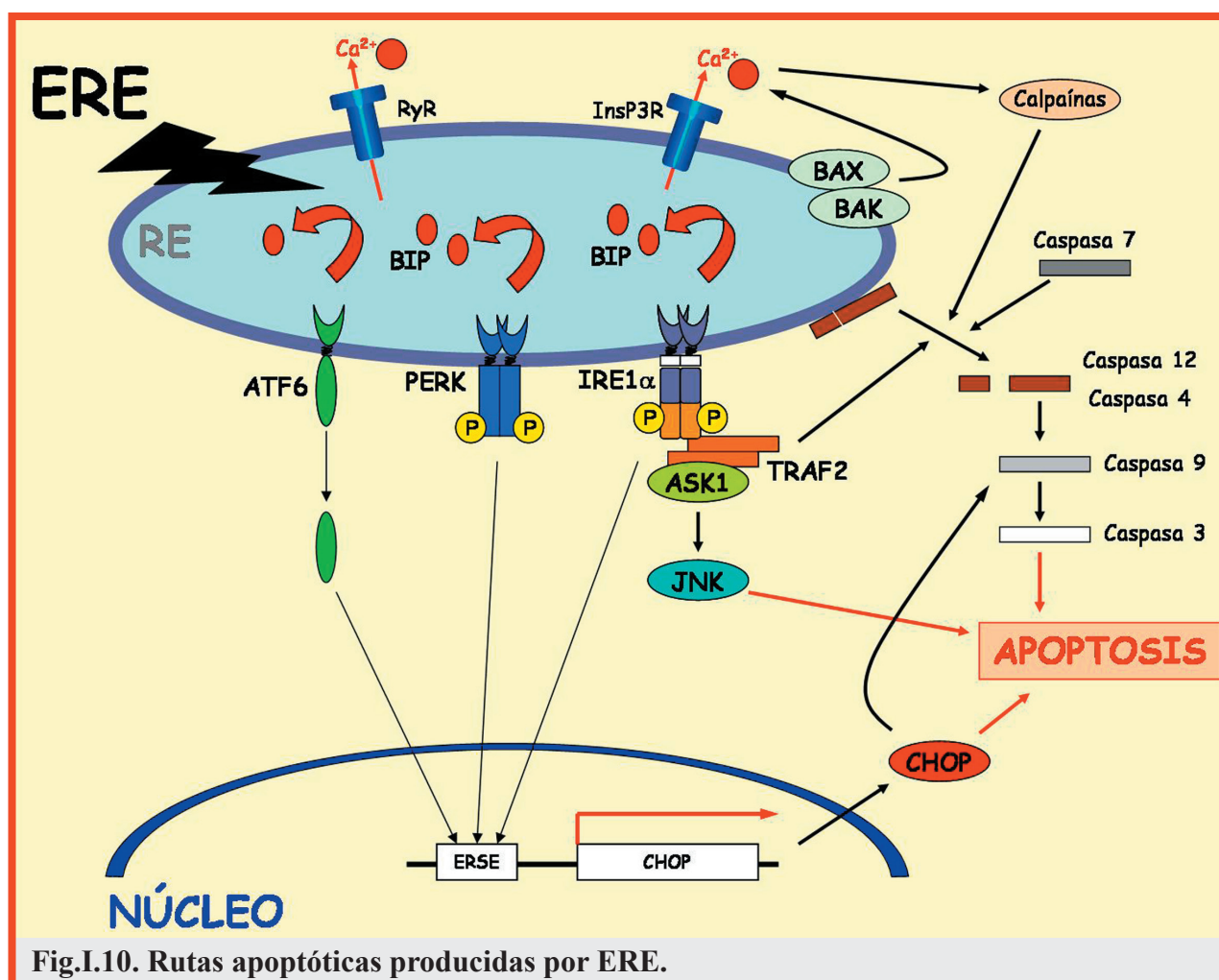


Fig.I.10. Rutas apoptóticas producidas por ERE.



### 1.3.5. Respuesta integrada a estrés.

En los últimos años se ha descrito la respuesta integrada a estrés (RIE) como una respuesta a estrés que regularía tanto el metabolismo de aminoácidos como la resistencia a estrés oxidativo (Harding y cols., 2003). Esta respuesta adaptativa engloba la respuesta UPR y los distintos mecanismos de fosforilación reversible del factor eIF2 $\alpha$ .

Se conocen cuatro quinasas en mamíferos que por diferentes señales de estrés llevarían a la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  en la Ser51: 1) PKR: la proteína quinasa activadora del RNA de doble cadena que es uno de los componentes mayoritarios de la respuesta antiviral mediada por el interferón (Maggi y cols., 2000); 2) GCN2: la quinasa encargada del control general del metabolismo del nitrógeno y que responde a la depleción de aminoácidos (Hinnebusch y cols., 1996); 3) HRI: la quinasa inhibidora de la hemo-regulación que responde a la carencia de grupos hemo en la síntesis de globina (Han y cols., 2001); y 4) PERK: (apartado 2.2.1.III) la quinasa PKR relacionada con el RE que responde a la acumulación de proteínas malplegadas en el RE por una de las vías de la UPR (Harding y cols., 2000).

Generalmente, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  proviene de un mecanismo fundamental en el que se acopla al grado de síntesis de proteínas con la capacidad de plegarlas bajo diferentes condiciones de estrés fisiológico.

Recientes estudios defienden la idea de que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  promueve la supervivencia celular bajo condiciones de EO y de acumulación de proteínas mal-plegadas en el ER (Boyce y cols., 2005; Lu y cols., 2004). En contraste se ha propuesto a eIF2 $\alpha$  como un mediador de apoptosis en respuesta a la activación de PKR (Donze y cols., 2004; Gil y cols., 1999; Hsu y cols., 2004; Srivastava y cols., 1998).

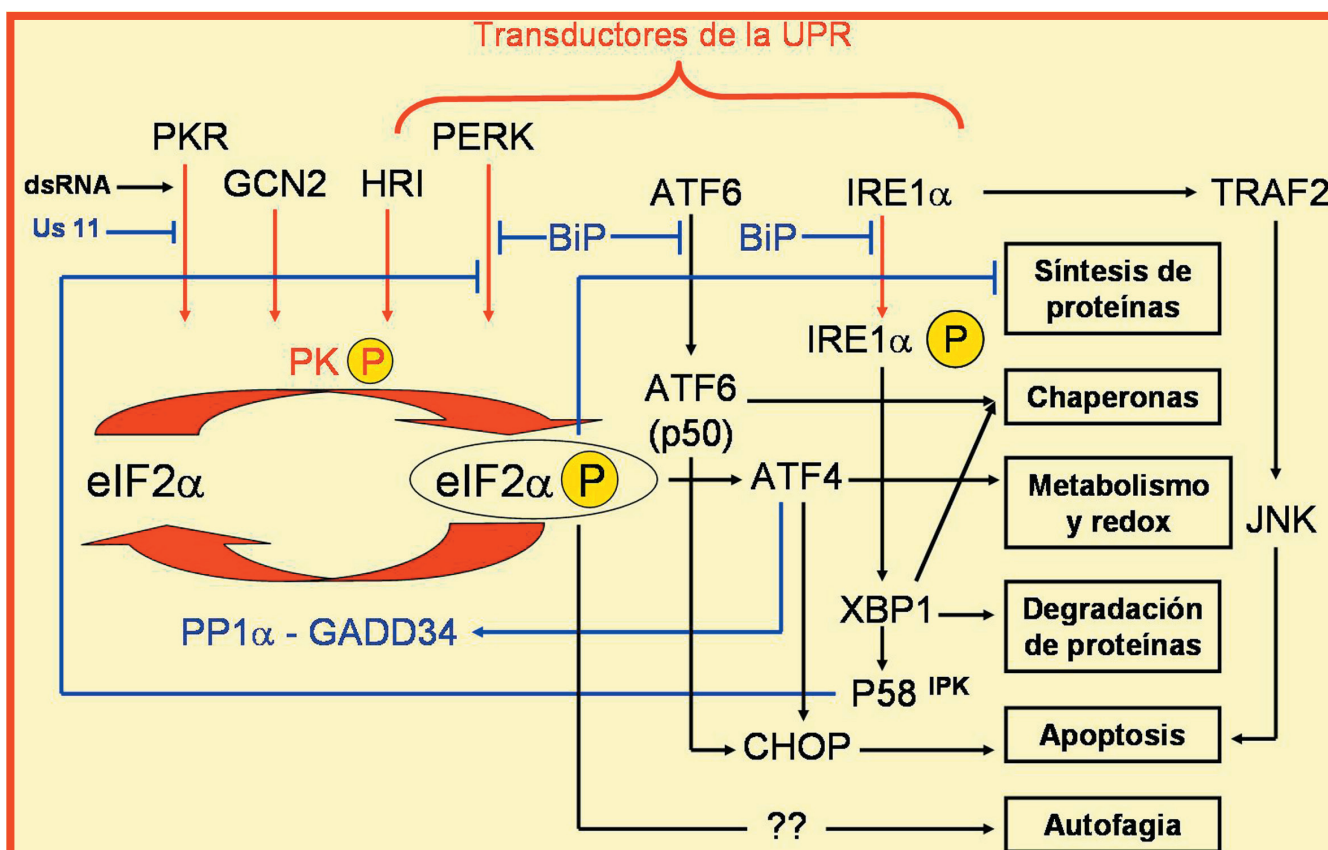


Fig.I.11. Respuesta integrada a estrés.



## Objetivos

---



La de Alzheimer es una enfermedad heterogénea con formas familiar y esporádica. La forma familiar es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones en tres genes -APP (Goate y cols., 1991), PS1 (Sherrington y cols., 1995), y PS2 (Levy-Lahad y cols., 1995a; Rogaev y cols., 1995)-. Sin embargo la causa de la forma esporádica es desconocida.

Nuestra hipótesis es que el envejecimiento, probablemente por el EO subyacente (Finkel y Holbrook, 2000), en concierto con el estrés de RE causado por las mutaciones en el APP y presenilinas, produce la neurodegeneración característica de la enfermedad de Alzheimer.

En este contexto, nos propusimos los siguientes objetivos:

- I. Obtención y caracterización de modelos celulares de ERE y de EO en la línea celular de neuroblastoma humano SKNMC.  
Una vez establecidos estos modelos, caracterización de un modelo de convergencia de ERE y EO en la misma línea celular.
- II. Análisis de la respuesta integrada a estrés (RIE) en los modelos celulares de EO, ERE y convergencia de ERE y EO.  
Caracterización de la muerte celular por medio del estudio de marcadores celulares asociados a procesos apoptóticos en estos modelos.
- III. Análisis de expresión diferencial y estudio genómico funcional de los modelos de ERE, EO y convergencia de ERE y EO.



## Materiales y Métodos

---





### 3.1 REACTIVOS.

Todos los reactivos empleados en el desarrollo de este trabajo son de grado analítico.

- Los siguientes reactivos fueron suministrados por Merck: cloruro sódico (NaCl), trizma base (tris), ácido clorhídrico (HCl), glicerol, acetato sódico, bromuro de etidio, cloruro magnésico ( $MgCl_2$ ), hidróxido sódico (NaOH), etanol, sacarosa, citrato sódico.
- Los siguientes reactivos fueron suministrados por Sigma: suero bovino fetal, seroalbúmina bovina (BSA), beta-mercaptoetanol, ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido etilen-glicol-bis( $\beta$ -aminoetileter) N,N,N',N',-tetraacético (EGTA), Triton X-100, deoxicolato sódico, N-dodecil- -D maltosa, Ponceau S, Hepes, dicloruro de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).
- Los siguientes reactivos fueron suministrados por BioRad: sodio dodecil sulfato (SDS), reactivo de Bradford, acrilamida, bisacrilamida y azul de bromofenol.
- Los siguientes reactivos fueron suministrados por Fluka: NP-40 y ácido ascórbico.
- Los siguientes reactivos fueron suministrados por Aldrich: Tween 20.
- Los siguientes reactivos fueron suministrados por GibcoBRL: agarosa.
- Los siguientes reactivos fueron suministrados por Calbiochem: 8-N,N-Dietilamino-octil-3,4,5-trimetoxibenzoato (TMB-8).
- Los reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa fueron suministrados: Amplitaq DNA polimerasa, tampón de reacción 10X y  $MgCl_2$  por Biotools y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) por Applied Biosystem.

Además de los reactivos generales mencionados se han empleado otros más específicos cuya procedencia se indica en los apartados correspondientes.

### 3.2. CULTIVOS CELULARES.

#### 3.2.1. Línea celular.

En la realización de este trabajo se han utilizado las células de neuroblastoma humano, establecidas en la línea SK-N-MC y que fue suministrada por “American Type Culture Collection” (ATCC, Ref. HTB-10). Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado (MEM) con el 10% de suero bovino fetal (FCS), glutamina 2mM, piruvato 1mM, aminoácidos no esenciales (alanina, aspártico, glutamina, prolina y asparagina) y una mezcla de antibióticos (estreptomicina y penicilina G) y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada de  $CO_2$  al 7%.

#### 3.2.2. Tratamientos de estrés oxidativo y de estrés de RE.

Cuando los cultivos están a un 80% de confluencia se siembran las células a una densidad de 800.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (M-6), 24 horas antes de iniciar los tratamientos y, alternativamente, a una densidad de 40.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (M-96), 48h antes de iniciar los tratamientos. En el momento de la estimulación, las células se incubaron una hora en medio fresco para crear las mismas condiciones en cada pocillo. Transcurrido ese tiempo, se sustituye por medio fresco (control) o por medio con el tratamiento, a las concentraciones y tiempos especificados en cada ensayo.

Para inducir estrés de RE se utilizó tunicamicina (Tm: Sigma), que inhibe la N-glicosilación de las proteínas, concentración del stock de 10mg/ml en DMSO. Alternativamente se utilizó taspigargina (Tg: Sigma), que inhibe la bomba ATPasa de entrada de  $Ca^{2+}$  al RE (SERCA), a una concentración de stock de 5mM en  $H_2O$ .

Para la inducción de estrés oxidativo (EO) se utilizó el sistema xantina/xantina oxidasa: la xantina (X: Sigma), a una concentración de stock de 0.1M en NaOH (1N), más xantina oxidasa (XOD: Roche), que produce liberación de aniones superóxido ( $O_2^-$ ). Alternativamente, se utilizó peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ : Merck), que produce la liberación de radicales hidroxilo.

### 3.3. ANTICUERPOS.

**Anti-Grp78.** Se utilizó el anticuerpo anti-Grp78, un anticuerpo policlonal de conejo (Stressgen) que tiene epítipo común para la Grp78 y la Grp94 humana, de ratón, de rata, de hamster y de *Xenopus*. La dilución empleada para inmunomarcado después de electroforesis fue 1:1000 (concentración final de 1 µg/ml).

**Anti-citocromo c.** Se utilizó el anti-citocromo c (BD Pharmingen), en concreto el clon 6H2.B4, que reconoce la forma desnaturalizada de paloma, caballo, rata, ratón y humano. La dilución empleada en inmunofluorescencia fue de 1:100 (concentración final de 10 µg/ml).

**Anti-GADD153 (F-168).** Se utilizó el anticuerpo anti-GADD153, un anticuerpo policlonal de conejo (Santa Cruz) que reconoce la GADD153 humana, de rata y de ratón. La dilución empleada para inmunomarcado después de electroforesis fue 1:50 (concentración final de 4 µg/ml).

**Anti-PARP fragmento p85 pAb.** Se utilizó el anticuerpo anti-p85, un anticuerpo policlonal de conejo (Promega) que reconoce el fragmento de 85 kDa de humano originado en el procesamiento proteolítico de PARP (poly ADP-ribose polimerase) que tiene lugar durante la muerte por apoptosis. El anticuerpo no reconoce la proteína entera (116 kDa). La dilución empleada para inmunomarcado después de electroforesis fue 1:1000 (concentración final de 1 µg/ml).

**Anti-eIF-2 $\alpha$ .** Se utilizó el anticuerpo anti-eIF-2 $\alpha$ , un anticuerpo monoclonal de ratón (Biosource) que reconoce la proteína de 36 kDa humana, de rata y de ratón. La dilución empleada para inmunomarcado después de electroforesis fue 1:1000 (concentración final 0.5 µg/ml).

**Anti-Phospho-eIF2 $\alpha$  (Ser51).** Se utilizó el anticuerpo fosfo-eIF2 $\alpha$ , un anticuerpo policlonal de conejo (Cell Signaling) que reconoce el eIF2 $\alpha$  endógeno sólo cuando está fosforilada en la Ser 51, no reconoce la eIF2 $\alpha$  fosforilada en cualquier otro sitio. La dilución empleada para inmunomarcado después de electroforesis fue 1:1000 (concentración final 1 µg/ml).

**Anti- $\alpha$ -tubulina:** Anti- $\alpha$ -tubulina (clon B-5-1-2) es un anticuerpo monoclonal de ratón (Sigma) que reconoce un epítipo C-terminal de la isoforma  $\alpha$  de la tubulina. Se utilizó para inmunomarcado después de electroforesis a una concentración final de 0,1 µg/ml.

**Anti-conejo acoplado a peroxidasa.** Anticuerpo generado en cabra, y suministrado por Nordic.

**Anti-ratón acoplado a peroxidasa.** Anticuerpo purificado, generado en caballo; se obtuvo de Vector Laboratories.

**Anti-ratón Alexa 488.** Anticuerpo purificado, generado en cabra; se obtuvo de Invitrogen.

**Anti-conejo Alexa 594.** Anticuerpo purificado, generado en cabra; se obtuvo de Invitrogen.

### 3.4. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS.

#### 3.4.1. Obtención de lisados celulares.

Las células, en las condiciones indicadas en cada apartado correspondiente, se recogieron de la placa, se lavaron con PBS1X por centrifugación a 200xg durante 5 minutos y, las células, fueron lisadas directamente en tampón de muestra que contiene Tris-HCl 25mM pH 6,3, glicerol 10%, SDS 2%, beta-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,01%.

#### 3.4.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó según el método discontinuo de Laemmli [Laemmli 1970]. Se utilizaron geles concentradores al 3% de acrilamida y geles separadores de porcentaje de acrilamida variable (8, 10 o 12%) en función del peso molecular de las proteínas a analizar. Se usaron los patrones de peso molecular coloreados Rainbow<sup>TM</sup> de alto peso molecular (Amersham Bioscience).

### 3.4.3. Inmunomarcado después de electroforesis en geles de poliacrilamida (“Western blot”).

Se siguió el método de Harlow y Lane [Harlow y cols. 1988]. Las proteínas resueltas en los geles de poliacrilamida se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (BioRad) con un tamaño de poro de 0,45µm durante 90 minutos y a una corriente de 1,3mA/cm<sup>2</sup> mediante el método de transferencia semiseca. Se comprobó la eficacia de la transferencia mediante tinción reversible de las proteínas de la membrana con rojo Ponceau S. La reactividad no específica fue bloqueada por incubación durante toda la noche a 4°C con BSA al 3% o al 5% (optimizado para cada ensayo particular) en tampón fosfato salino (PBS) y Tween 20 al 0,2%. Las membranas se incubaron después durante 2h a temperatura ambiente con los distintos anticuerpos primarios (especificados en el apartado 4.3) diluidos en PBS con BSA al 1% (o al 3% según el caso) y Tween 20 al 0,05%. Tras varios lavados en PBS-Tween-20 0,05%, las membranas se incubaron durante 2h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa diluidos 1:50.000 en PBS-BSA1%. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron con el reactivo quimioluminiscente intensificado ECL (Amersham Bioscience). Posteriormente, se cuantificaron las bandas resultantes mediante densitometría (densitómetro GS-710 “Calibrated Imaging Densitometer” de BioRad).

En todos los casos se utilizó la cantidad de  $\alpha$ -tubulina para normalizar la medida, ya que la cantidad de esta proteína se mantiene constante en las células y no varía con los tratamientos. La tubulina se visualiza por inmunomarcado, como se ha descrito en el párrafo anterior usando el anticuerpo primario correspondiente.

## 3.5. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.

### 3.5.1. Fundamento de la técnica.

La sal de tetrazolio, MTT, es un compuesto permeable en la célula que se reduce a formazán, un compuesto coloreado que puede ser cuantificado mediante un ensayo colorimétrico. La capacidad de reducción de este compuesto ha sido interpretada como indicativa del estado redox celular (Altman, 1976; Shearman y cols., 1994; Shearman y cols., 1995), de la integridad mitocondrial (Rago y cols., 1991; Berridge y Tan, 1993), y en el análisis de proliferación celular y citotoxicidad (Mosmann, 1983).

### 3.5.2. Ensayos de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Las células (30.000 células/pocillo) se sembraron 48 horas antes de iniciar los tratamientos, en placas de 96 pocillos (Costar) en medio de cultivo, a 37° C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 7%.

El ensayo consistió en una modificación del protocolo original descrito por Hansen y cols. (1989). Dos horas antes de finalizar los tratamientos de los cultivos celulares se adicionó el MTT (stock 5 mg/ml en PBS) sobre el medio de cultivo a una concentración final de 0.5 mg/ml. y se incubó durante 3 horas a 37° C, protegido de la luz. Transcurrido este tiempo, se añadió sobre el medio un volumen de 100µl de tampón de lisis (20% SDS en 50% N,N-dimetilformamida, pH 4.7) y se incubó toda la noche a 37° C en oscuridad. La cantidad de formazán producida se valoró midiendo la absorbancia del medio a una longitud de onda de 550 nm, utilizando como blanco una incubación libre de células, en un lector de placas de ELISA Microplate Reader model 680 (BioRad).

## 3.6. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).

### 3.6.1. Fundamento de la técnica.

La sonda fluorescente sensible a ROS, diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA: Molecular Probes), es un compuesto no polar que difunde rápidamente en las células, donde es hidrolizado por esterasas intracelulares al derivado no fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína. La

sonda reacciona preferentemente con peróxido de hidrógeno e iones superóxido (Cathcart y cols., 1983; Royall y Ischiropoulos, 1993; Bass y cols., 1983). La oxidación de la sonda genera un producto polar y fluorescente –2',7'-diclorofluoresceína– que se excita a una longitud de onda de 502 nm y emite a una longitud de onda de 523 nm. Se utilizó a una concentración final de 30  $\mu$ M (el stock se preparó a una concentración de 30 mM en DMSO).

### 3.6.2. Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Las células se sembraron (30.000 células/pocillo) 48 horas antes de iniciar los tratamientos, en placas de 96 pocillos (Costar) en medio de cultivo.

La determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno se llevó a cabo mediante la utilización de la sonda diacetato de diclorofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ), modificando técnicas descritas (Rosenkranz y cols., 1992). Brevemente, tras lavar las células con tampón HKRB (HEPES 20 mM, NaCl 103 mM, KCl 4.77 mM,  $CaCl_2$  0.5 mM,  $MgCl_2$  1.2 mM,  $KH_2PO_4$  1.2 mM,  $NaHCO_3$  25 mM, glucosa 15mM), pH 7.3, se adicionó sobre el medio la sonda a una concentración final de 30  $\mu$ M y se incubaron durante 2 horas protegidas de la luz. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se lavaron las células con tampón HKRB suplementado con 2% FCS. Se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de tampón HKRB suplementado con 2% FCS y se incubaron las placas durante 1 hora a 37° C, protegidas de la luz. Transcurrido este tiempo se midió la fluorescencia en un fluorímetro para placas multipocillo Fluoscan II Neonat (Flow Laboratories) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 538 nm.

Esta medida fue normalizada en cada uno de los pocillos mediante la medida de LDH interna, utilizando para ello el método de LDH (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor.

### 3.6.3. Ensayo de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular. Con el fin de determinar el porcentaje de células viables, se lisaron las células que permanecían adheridas a las placas después de realizar el experimento de liberación de ROS y se cuantificó la enzima LDH liberada al medio de cultivo mediante un ensayo enzimático acoplado que resulta en la conversión de una sal de tetrazolio en un formazán rojo. Para este ensayo, se utilizó el kit comercial CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor. La cantidad de LDH se determinó como absorbancia a 490 nm en un lector de placas de ELISA Microplate Reader model 680 (BioRad).

## 3.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO CITOSÓLICO LIBRE.

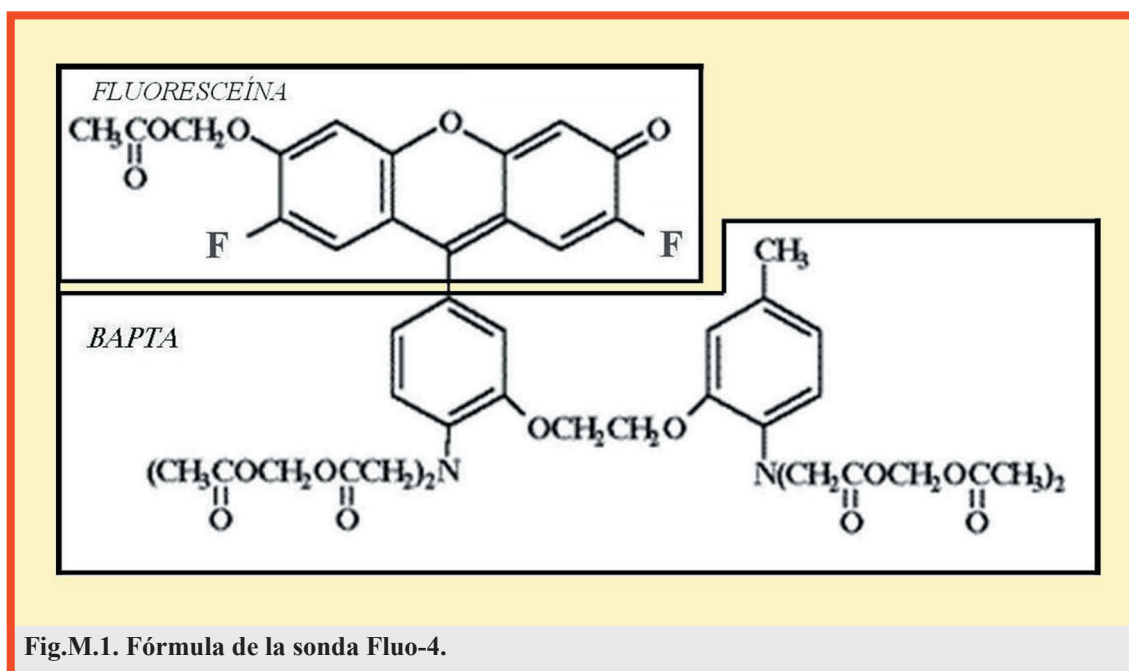
### 3.7.1. Fundamento de la técnica.

Como inhibidor de la liberación de  $Ca^{2+}$  del ER, usamos el 8-N,N-Dietilamino-octil-3,4,5-trimetoxibenzoato (TMB-8; Calbiochem), que inhibe los receptores de rianodina (Rya), que junto con los receptores de inositol trifosfato (IP3), son los encargados de mantener la homeostasis de  $Ca^{2+}$  en el ER por la liberación de este al citosol.

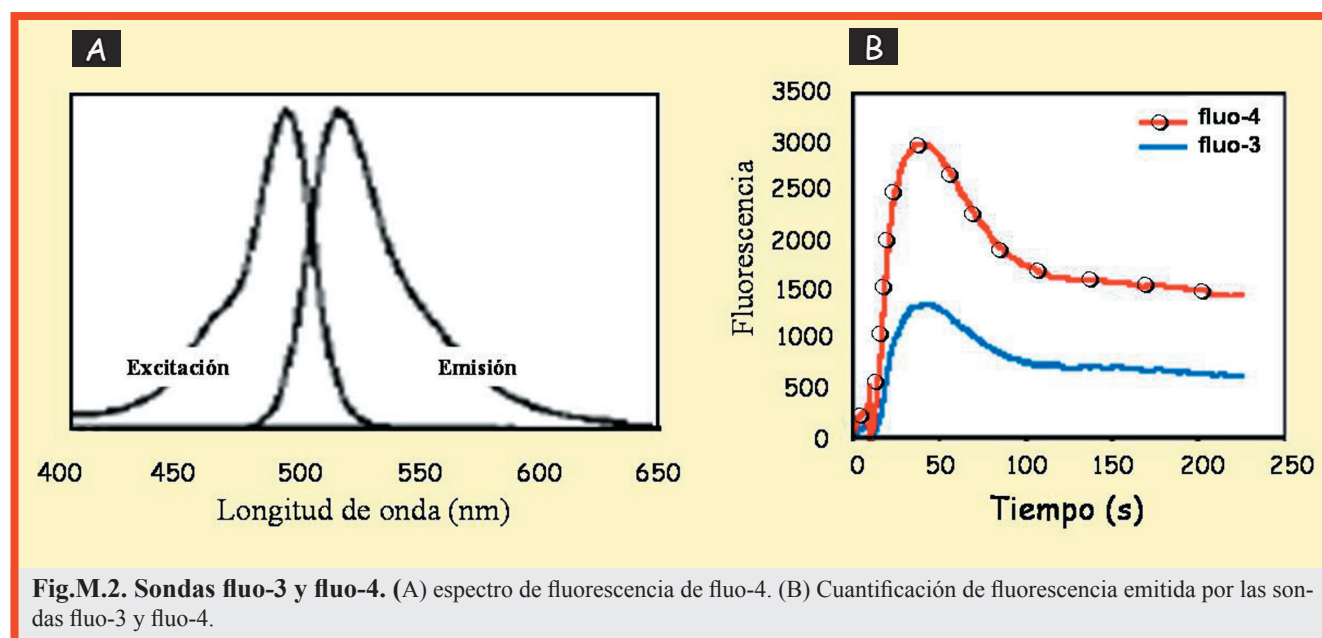
En el tampón Tyrode-Heppes usamos probenecid, ya que es un inhibidor del transportador aniónico de la membrana plasmática y su uso reduce la pérdida de la sonda fluorescente, con lo que conseguimos reducir la fluorescencia basal en el medio y observar mejor los cambios en la fluorescencia.

Para determinar la  $[Ca^{2+}]_c$  se utilizó la sonda fluorescente fluo-4, un compuesto que al unirse al  $Ca^{2+}$  emite fluorescencia. Este marcador fluorescente puede atravesar la membrana celular, en forma de éster de acetoximetilo (fluo-4/AM), entrando en las células, donde las esterasas endógenas hidrolizan este enlace transformándolo en fluo-4. El fluo-4 es un derivado del quelante de  $Ca^{2+}$  BAPTA unido covalentemente a un fluorocromo, la fluoresceína (fig. M.1.).

Esta sonda fluorescente se desarrolló por Gee y cols. en el año 2000, por una ruta de síntesis



similar a la del fluo-3 (Minta y cols., 1989), sustituyendo en el fluoróforo dos radicales cloro por dos radicales flúor, lo que le confiere un cambio en la excitación máxima que se traduce en un incremento en la señal de fluorescencia (fig. M.2.). En el panel A se representa el espectro de fluorescencia de fluo-4 y observamos que el máximo de excitación es a 494nm, a diferencia del fluo-3 que es a 506nm. En el panel B se pone de manifiesto el incremento en la señal de fluorescencia que le confiere al fluo-4 este cambio en la excitación máxima; podemos observar como con la misma concentración de fluo-3 o de fluo-4 la señal de fluorescencia es mayor en las células incubadas con fluo-4.



### 3.7.2. Medida de la concentración de calcio citosólico libre.

Sembramos las células SK-N-MC (30.000 células/pocillo) 48h antes de empezar el experimento, en placas opacas de 96 pocillos (M-96) que habían sido tratadas con 100mg/ml de polilisina. Se dejaron en oscuridad durante 1h a 37°C en medio fresco que contenía fluo-4/AM (10μM) y una vez transcurrido ese tiempo, las células se incubaron en oscuridad durante 1h con medio fresco sólo o con TMB-8 (según el ensayo).

Una vez finalizado el pre-tratamiento, las células se lavaron en una solución Tyrode-Hepes (en mM: NaCl 145, KCl 2,7, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1,8 (se elimina este compuesto cuando hacemos el medio



libre de calcio), D-glucosa 10 y Hepes 10) con 1mM de probenecid y con o sin 0.5mM de EGTA, y posteriormente se mantuvieron 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, para permitir la hidrólisis del enlace éster de la sonda por las esterasas intracelulares.

Para cuantificar la fluorescencia emitida por el fluo-4 se utilizó un fluorímetro modelo Fluostar, BMG Labtegnologies. La placa se colocó en este lector de fluorescencia y cuantificamos la señal basal emitida por la sonda fluo-4 (excitación 485nm, emisión 520nm). Posteriormente se determinó la fluorescencia en las diferentes situaciones experimentales, el protocolo utilizado se especifica al describir los resultados en el correspondiente apartado.

En estos experimentos normalizamos la señal de fluorescencia de cada pocillo, añadiendo al final tritón (2%), para permeabilizar las células y poner así todo el  $\text{Ca}^{2+}$  del pocillo en contacto con la sonda, lo que nos permite registrar el valor de fluorescencia máxima ( $F_{\text{máx}}$ ) en cada pocillo. Después se añadió a cada pocillo  $\text{MnCl}_2$  100mM, disociando el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -fluo-4, lo que permite registrar la fluorescencia del fluo-4 en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , fluorescencia mínima ( $F_{\text{mín}}$ ). En cada experimento se valoró el efecto de los diferentes tratamientos por triplicado y los resultados se presentan como el porcentaje de  $F - F_0 / F_{\text{máx}} - F_{\text{mín}}$ . Para corregir la pérdida de la sonda, en cada experimento reservamos tres pocillos para monitorizar los cambios de fluorescencia a lo largo del tiempo.

### 3.7.3. Medida del $\text{Ca}^{2+}$ citosólico libre en célula única cargada con fluo-4.

Se sembraron 200.000 células SK-N-MC en placas p-35 y se incubaron en oscuridad durante 1h a 37°C en medio fresco que contenía fluo-4/AM 10 $\mu\text{M}$ . Una vez transcurrido ese tiempo, las células se incubaron en oscuridad durante 1h con medio fresco.

Una vez finalizado el pre-tratamiento, las células se lavaron en una solución Tyrode-Hepes (en mM: NaCl 145, KCl 2,7,  $\text{MgCl}_2$  1,  $\text{CaCl}_2$  1,8, D-glucosa 10 y Hepes 10) con 1mM de probenecid y posteriormente se mantuvieron 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y empezamos el experimento en un microscopio de fluorescencia invertida (Nikon eclipse TE300). La sonda fluo-4 fue excitada con luz a 485nm; la luz emitida fue transmitida a través de un espejo dicróico a 505nm y el filtro de emisión a 520nm antes de ser detectado por el fotomultiplicador. Los datos fueron analizados usando el programa Metamorph v 2.2.

Las células fueron tratadas alternativamente con 1mM de  $\text{K}^+$  entre cada uno de nuestros tratamientos, y con un coctel de vaciado del RE que es una disolución de 50mM de cafeína, 1 $\mu\text{M}$  de Tg y 10 $\mu\text{M}$  de rianodina.

## 3.8. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.

### 3.8.1. Fundamento de la técnica.

En este trabajo hemos valorado los cambios del potencial de membrana mitocondrial usando la sonda fluorescente TMRE (tetrametilrodamina etil éster, fig. M.3.). El TMRE es una sonda catiónica que atraviesa las membranas celulares y se acumula selectivamente en las mitocondrias. La captación y el equilibrio de este compuesto fluorescente en las mitocondrias es rápido y se consigue en unos minutos.

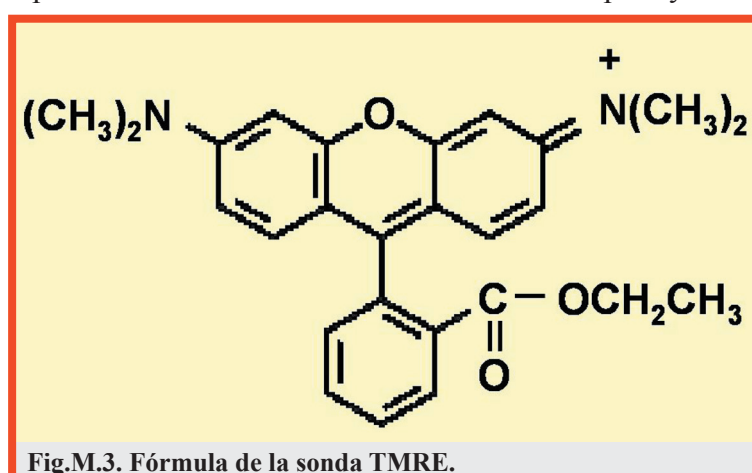


Fig.M.3. Fórmula de la sonda TMRE.

Esta sonda no es tóxica para las células y es altamente fluorescente, características que garantizan su utilización para monitorizar cambios del potencial de membrana mitocondrial.

Uno de los protocolos establecidos para medir el potencial de membrana mitocondrial con esta molécula y otras catiónicas, es el método de apagado de la sonda (Mojet y cols., 2001). Estos compuestos, a altas concentraciones (1-20mM), sufren un fenómeno de autoapagado de la fluorescencia. La depolarización de la mitocondria promueve la redistribución de la sonda al citosol; y al disminuir la concentración de TMRE en la mitocondria se previene el autoapagado de la sonda, incrementándose así la fluorescencia celular. Por lo tanto, la despolarización mitocondrial se visualiza como un incremento de la fluorescencia asociada al TMRE.

### **3.8.2. Medida de la despolarización de la membrana mitocondrial en célula única cargada con TMRE.**

Se sembraron 200.000 células SK-N-MC en placas p-35 y se incubaron en oscuridad durante 1h a 37°C en medio fresco, a los 45 minutos añadimos 3µM de TMRE. Una vez finalizados los 15 minutos con la sonda fluorescente, las células se incubaron en oscuridad durante 1h con medio fresco.

Una vez finalizado el pre-tratamiento, las células se lavaron en una solución Tyrode-Hepes (en mM: NaCl 145, KCl 2,7, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1,8, D-glucosa 10 y Hepes 10) con 1mM de probenecid y posteriormente se mantuvieron 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente después empezamos el experimento en un microscopio de fluorescencia invertida (Nikon eclipse TE300). La sonda TMRE fue excitada con luz a 545nm; la luz emitida fue transmitida a través de un espejo dicróico a 575nm y el filtro de emisión a 585nm antes de ser detectado por el fotomultiplicador. Los datos fueron analizados usando el programa Metamorph v 2.2.

Las células fueron tratadas alternativamente con 1mM de K<sup>+</sup> entre cada uno de nuestros tratamientos, y con un coctel de vaciado del RE que es una disolución de 50mM de cafeína, 1µM de Tg y 10µM de rianodina.

## **3.9. DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE CITOCROMO C AL CITOSOL.**

### **3.9.1. Fundamento de la técnica.**

En situaciones patológicas, la función mitocondrial se altera, produciéndose la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. La consecuente caída en los niveles de ATP y la apertura del poro de transición mitocondrial favorece la liberación al citoplasma de partículas pro-apoptóticas como el citocromo c.

**Dihidrocloruro de 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI).** El DAPI (Sigma) es un agente fluorescente, permeable en la membrana, que se une de forma reversible al surco menor del DNA de doble cadena, formando un complejo estable cuya fluorescencia es unas 20 veces mayor que la del DAPI no unido a DNA. El DAPI unido a DNA se excita a una longitud de onda de 364 nm y emite a una longitud de onda de 454 nm. El stock se preparó a una concentración de 5 mg/ml en agua.

### **3.9.2. Ensayo ELISA “Sandwich” para la cuantificación de citocromo c liberado al citosol.**

Las células SK-N-MC se sembraron (800.000 células/pocillo) 24h antes en placas de 6 pocillos (M-6) y se incubaron a diferentes tiempos con medio sólo o con cada uno de nuestros inductores de estrés. La cantidad de citocromo c liberado desde el espacio intermembranal de la mitocondria al citosol fue cuantificado por el kit de Elisa “Sandwich” para citocromo c (humano) siguiendo las instrucciones del fabricante (Apotech Corporation/CH). Los valores fueron normalizados por cantidad de proteína total medida por el método BCA (Pierce).

### **3.9.3. Determinación de la liberación de citocromo c por inmunocitoquímica.**

Las células SK-N-MC se sembraron a una densidad de 120.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos (M-24) con cubreobjetos sin tratar, lavados en etanol y secados en llama. La fijación de las células se realizó con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M pH 7.4 durante 20 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se lavaron tres veces las células suavemente con 1 ml de PBS (pH 7.4).

Después de la fijación, las células se permeabilizaron y bloquearon durante 1h a 4° C con una disolución de bloqueo compuesta por 0.2% Tritón X-100, 2% suero de caballo (Gibco) en PBS (pH 7.4). A continuación se incubaron con el anticuerpo monoclonal (anti-citocromo c, Pharmingen), diluido 1/100 en disolución de bloqueo, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario Alexa 488 de ratón a una dilución 1/500 en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

A continuación, con el fin de llevar a cabo la tinción de los núcleos, los cubreobjetos fueron incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con DAPI a una concentración final de 5 µg/ml en PBS.

Posteriormente, se lavaron los cubreobjetos con agua y se deshidrataron gradualmente con concentraciones crecientes de etanol al 25, 50, 75 y 100%. Una vez deshidratados, se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia, Mowiol, y se visualizaron al microscopio de fluorescencia (Olympus Bx51).

### 3.10. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

#### 3.10.1. Fundamento de la técnica.

**Yoduro de propidio:** (IP; Molecular Probes) es un agente intercalante que se une estequiométricamente a las moléculas de DNA y RNA cuando la integridad de la membrana plásmática está dañada (Darzynkiewicz y cols., 1994), utilizado habitualmente para determinar el contenido de DNA en estudios de ciclo celular; la presencia de contenido de DNA menor que 2C (contenido hipodiploide) indica la existencia de células apoptóticas. El yoduro de propidio se excita a una longitud de onda de 535 nm y emite a una longitud de onda de 617 nm. Se utilizó a una concentración final de 0.15 mM.

**Z-VAD-fmk:** Inhibidor irreversible de amplio espectro de las caspasas. Se obtuvo de Alexis® Biochemicals (Braun y cols., 1999) y corresponde a la secuencia: N-benziloxycarbonil-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona.

Para la preparación del stock, fue solubilizado en metanol a una concentración de 22 mM y se utilizó a una concentración final de 50 µM.

#### 3.10.2. Análisis de la progresión del ciclo celular por citometría de flujo.

Las células SK-N-MC se sembraron (800.000 células/pocillo) en una placa de 6 pocillos (M-6) y se incubaron a diferentes tiempos con los inductores de estrés en presencia o ausencia del inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk. Después se levantan del soporte plástico en su propio medio mediante raspado, para así recoger tanto las células que permanecían adheridas, como las células muertas que flotaban en el medio, se centrifugaron durante 5 minutos a 200xg y se lavan extensivamente con PBS. A continuación se fijan con etanol al 30% en PBS durante 12h a 4°C, tras lo que se centrifugan a 800xg durante 5 minutos a 4°C y se lavan primero con etanol al 70% y después con PBS, seguido de centrifugación en ambos casos. Las células se incuban por último, durante 45 minutos a 37°C, con: citrato sódico al 0,1%, NP-40 al 0,3%, yoduro de propidio 0,05mg/ml (Sigma) y RNasa A 0,02mg/ml (Boehringer Mannheim). Las células fijadas y tratadas son analizadas posteriormente mediante citometría de flujo usando el citómetro FACScalibur (BD Biosciences), el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular se calcularon utilizando el programa Cell Quest (BD Biosciences), eliminando del análisis los agregados celulares. La apoptosis se determinó como el porcentaje de células con un contenido de DNA subG0/G1 en la zona del histograma intensidad de IP-área (Robinson y cols., 1997).



### 3.10.3. Marcaje de caspasa 3 activa.

El marcaje fue efectuado siguiendo el método descrito por Belloc y cols. en el año 2000. Las células fueron sembradas (800.000 células/pocillo) en una placa de 6 pocillos (M-6) 24h antes de ser incubadas con los diferentes tratamientos, en presencia o ausencia de Z-VAD-fmk. Transcurridos los tiempos de incubación, las células fueron sedimentadas y resuspendidas en 200µl del tampón de tinción (0,01% Na<sub>3</sub>N, 0,2% saponina y 5% BSA en PBS) e incubadas 15 minutos a 25°C. Posteriormente, las células se centrifugaron y se marcaron con 50 µl de tampón de tinción que contiene 2µl de anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 activa (BD Biosciences-PharMingen) conjugado a phycoerythrin (PE) durante 20 minutos a 4°C. Las muestras fueron lavadas 2 veces con tampón de tinción y analizadas por citometría de flujo (FACS Calibur).

## 3.11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR EN ARRAY.

### 3.11.1. Aislamiento del RNA total.

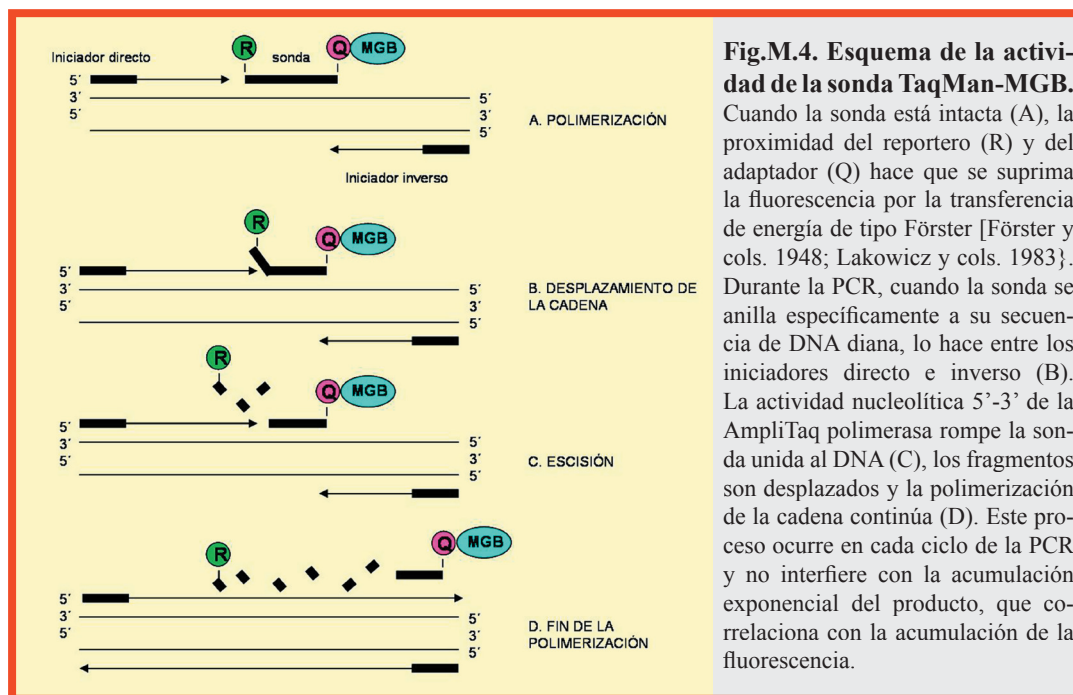
Las células tratadas se lisaron con Tripure (Boehringer Mannheim), donde se extrajo el RNA total mediante el protocolo indicado por el fabricante, basado en el método de extracción con fenol/cloroformo de Chomczynski y Sacchi [Chomczynski y cols., 1987]. Alternativamente, el RNA total fue aislado con un kit de extracción en columnas, el High Pure RNA Isolation Kit (Roche), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Con el fin de valorar la calidad y cantidad de RNA obtenido, se sometió el producto de cada extracción a electroforesis en geles de agarosa al 1%, en tampón TAE (tris-acetato 40mM y EDTA pH 8 1mM). El gel es teñido después de la electroforesis con bromuro de etidio a 5µg/ml en TAE y visualizado mediante luz ultravioleta. Todos los reactivos usados están libres de ribonucleasas. También, alternativamente, el RNA fue analizado y cuantificado en el NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

### 3.11.2. Fundamentos sobre el funcionamiento de la sonda TaqMan-MGB.

La reacción de PCR explota la actividad 5' nucleasa de la polimerasa usada, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, para romper la sonda TaqMan durante la PCR. La sonda TaqMan-MGB contiene una marca reportera ® fluorescente en el 5' (puede ser FAM, TET o VIC) y en 3' un captador de fluorescencia o "quencher" no fluorescente (Q) y otra modificación denominada MGB (minor groove-binder) que se une al surco menor del DNA favoreciendo la consecución de la PCR. Durante la reacción, la ruptura de la sonda provoca la separación del R y el Q, lo que hace que aumente la fluorescencia de la marca reportera. La acumulación de los productos de PCR es detectada directamente mediante la monitorización del aumento de la fluorescencia (fig. M.4.).

Para caracterizar los cambios en la expresión de varios genes de interés a lo largo del tiempo, producidos por nuestros inductores de estrés, decidimos realizar una PCR cuantitativa en array, que permite cuantificar la expresión de un gran número de genes en un sólo experimento. Usamos unas tarjetas preconfiguradas por Applied Biosystem con 384 pocillos, en los que están liofilizados dos o tres (depende del ensayo) iniciadores específicos de cada gen y la sonda TaqMan-MGB (en cada pocillo hay un gen problema diferente).



### 3.11.3. Síntesis de cDNA por retrotranscripción.

La retrotranscripción se llevó a cabo con el kit “High Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystem), para cada muestra de 1 µg de ARN se usan 4 unidades de la transcriptasa reversa “MultiScribe Reverse Transcriptase”, dNTPs, tampón específico y como iniciadores se usan hexámeros al azar, en las concentraciones indicadas por el fabricante a un volumen final de 100 µM. Los tubos con la mezcla de reacción se sometieron a los siguientes ciclos de temperatura en el termociclador GeneAmp PCR system 2400 o 9600 (Perkin-Elmer):

### 3.11.4. PCR cuantitativa en array.

El cDNA obtenido para cada condición, células incubadas en medio solo o con Tm, X-XOD y con ambos simultáneamente a los tiempos indicados en cada experimento, es ensayado para los iniciadores específicos, junto con la sonda TaqMan-MGB. Todas las medidas se hacen por duplicado.

Sobre la tarjeta preconfigurada se reparte por microfluidez la mezcla de reactivos TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystem): AmpliTaq Gold polimerasa, tampón específico,

Proceso: RT	PASOS	Temperatura	Tiempo
	Preincubación	25°C	10 minutos
	Incubación	37°C	120 minutos

MgCl<sub>2</sub> y dNTPs, en las concentraciones optimizadas por el fabricante y 5 µl de cDNA proveniente de la retrotranscripción (correspondiente a 50 ng del RNA original).

Las tarjetas con la mezcla de reacción se someten a los siguientes ciclos en un termociclador específico para este soporte: ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystem), que nos va a permitir cuantificar a tiempo real las muestras analizadas:

## 3.12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL POR MICROARRAY DE DNA.

### 3.12.1. Microarrays de DNA.

Se lleva a cabo el análisis de la expresión génica, en cultivos de neuroblastoma SK-N-MC, por Affymetrix y por Applied Biosystems. Las células SK-N-MC se incubaron durante 18h en medio de cultivo al que se le añade Tm, X-XOD y Tm+X-XOD; como control se preparan las células sin tratar.

Proceso:	PASOS	Temperatura	Tiempo
PCR a tiempo real			
	Preincubación	50°C	2 minutos
	Desnaturalización	94,5°C	10 minutos
	Desnaturalización	97°C	30 segundos
Nº ciclos: 40	Anillamiento y	59,7°C	1 minuto
	elongación		

El RNA total aislado, una vez comprobada su pureza e integridad, fue enviado a Medplant Genetics, S.L. (Baracaldo, Vizcaya), donde fueron realizados los experimentos de análisis de la expresión génica, utilizando la plataforma “*genechip*” de Affymetrix® HG-U133A, que tiene sondas para 22.215 genes humanos.

Alternativamente, para el análisis por Applied Biosystems, se envía el RNA total al Servicio de Genómica del CNIC, que utiliza la plataforma Applied Biosystems 1700, donde se realizan las hibridaciones; posteriormente nos envían los datos de los experimentos. Se utilizan microarrays de genoma humano completo (AB Human Genome Survey Microarray V2.0).

La “minería” de los resultados fue realizada por Pedro Carmona del laboratorio del Dr. Carazo (CNB).

### 3.12.2. Análisis de expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial en cada plataforma fue llevado a cabo conjuntamente con el análisis de hibridación por cada una de las compañías. Para cada gen, se suministró un *p*-valor que indica la significancia de que el gen esté diferencialmente expresado en la muestra control respecto a la muestra problema. Aquellos genes con *p*-valores < 0.05 se seleccionaron para llevar a cabo el análisis de las funciones asociadas a cada condición experimental.

Adicionalmente se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial utilizando el método de *Rank Products* (RP) publicado por [Breitling y cols., ], una metodología no paramétrica especialmente adecuada para el análisis de expresión diferencial cuando el número de replicados es reducido.

### 3.12.3. Análisis funcional en lista de genes.

Para extraer información sobre los procesos biológicos asociados al sistema experimental a partir de las listas de genes diferencialmente expresados o inhibidos se ha llevado a cabo un análisis estadístico de las anotaciones biológicas presentes en cada lista.

Para ello se han utilizado las anotaciones de la base de datos de *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>). *Gene Ontology* es una base de datos de ontologías que suministra un vocabulario estandarizado y controlado para la anotación de genes y proteínas a tres niveles distintos; proceso biológico, localización celular y función molecular. La información sobre la anotación de genomas completos está accesible en la misma base de datos de *Gene Ontology* o a través de otros servidores de información de datos biológicos.

Usando esta fuente de anotaciones se pueden determinar las anotaciones presentes en cada lista de genes y calcular la significancia estadística de las mismas. Para ello se ha determinado un *p*-valor para cada categoría calculando la probabilidad de que *x* o más genes en una lista de *K* pertenezcan a una determinada categoría *A*, dado que *M* de los *N* genes contenidos en el chip están anotados con dicha categoría. Este *p*-valor se ha calculado usando un test estadístico basado en la distribución binomial [Masseroli, 2004 #1], donde el *p*-valor para una categoría dada viene determinado por;

$$p = 1 - \sum_{i=0}^{x-1} \binom{K}{i} \left(\frac{M}{N}\right)^i \left(1 - \frac{M}{N}\right)^{k-i}$$

Aquellas anotaciones de procesos biológicos con  $p$ -valores menores que 0.05 pueden considerarse que están significativamente asociadas a la lista de genes estudiados y pueden usarse para inferir procesos biológicos que pueden jugar papeles relevantes en el sistema experimental.

Para llevar a cabo este análisis hemos utilizado la herramienta de *Panther Classification System* (<http://www.pantherdb.org/>) para el análisis de datos obtenidos con los chips de Applied Biosystems y la herramienta Onto-Express (<http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress/>) para el análisis de los datos obtenidos con los chips de Affymetrix.

### 3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

El análisis estadístico se realizó sometiendo la media control y la media problema a una prueba  $t$  de Student de dos colas empleando el programa Microsoft Excel.

Resultados

---



#### 4.1. DEFINICIÓN DE UN MODELO CELULAR DE COEXISTENCIA DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (ERE) Y DE ESTRÉS OXIDATIVO (EO).

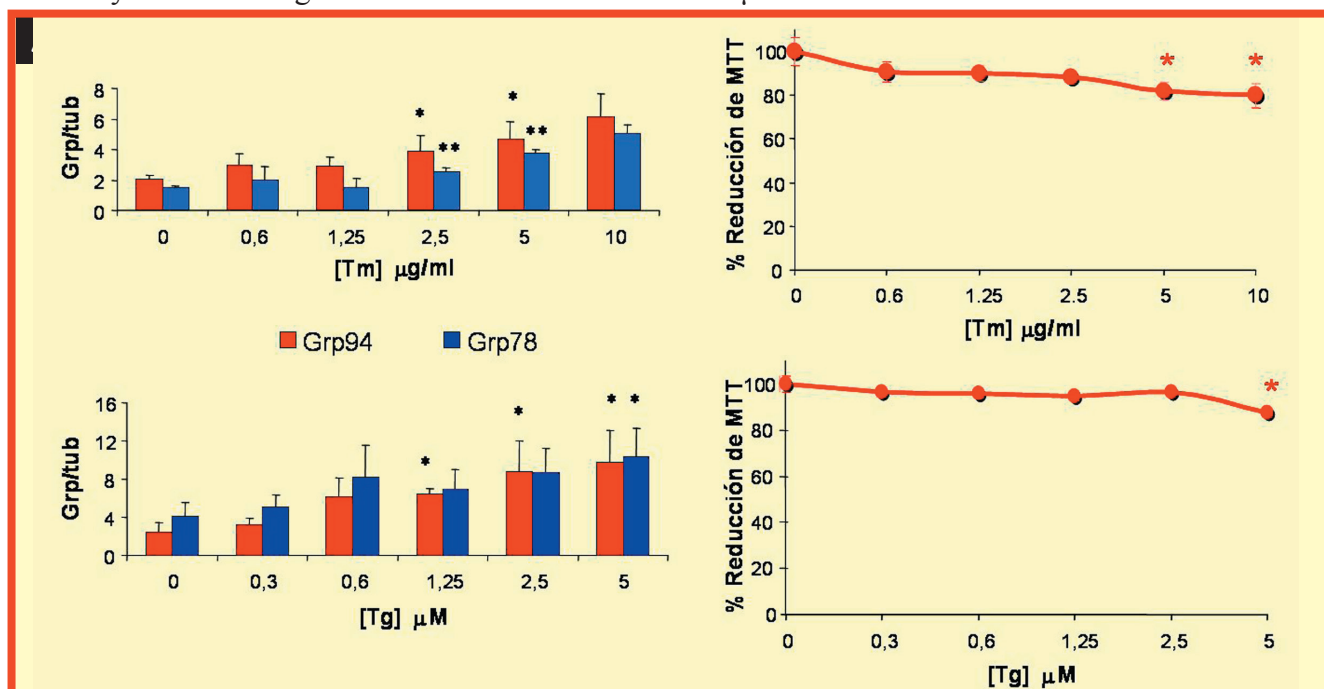
Con el propósito de investigar las posibles alteraciones producidas por un ERE continuado (por mutaciones en diferentes genes tales como las de PS1 y las de APP (Katayama y cols., 1999), en presencia de EO (inherente al paso de los años) (Finkel and Holbrook, 2000), y conseguir así un modelo celular de neurodegeneración inducido por la coexistencia de estos dos tipos de estrés, se establecieron previamente los dos modelos celulares individuales. La caracterización del modelo de ERE en la línea celular de neuroblastoma humano SKNMC, y posteriormente, del modelo de EO, se desarrolló con las medidas de la expresión de Grp78/Bip y Grp94 (chaperonas de respuesta a estrés de RE), la viabilidad celular y los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

##### 4.1.1. Modelo celular de ERE.

Para elegir un tratamiento que fuera controlable y nos permitiera desarrollar en el cultivo un estrés específico de RE, nos centramos en dos drogas en concreto; una que producía estrés por la inhibición de la N-glicosilación de proteínas por exposición de las células a tunicamicina (Tm), y otra, que provocaba la disminución de las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE por inhibición de la bomba ATPasa (SERCA) después de la exposición a tapsigargina (Tg).

Para la caracterización del ERE incubamos las células SKNMC con cada una de las drogas a diferentes concentraciones a un tiempo fijo de 18 horas, y en ambos casos se analizó, por inmunomarcado después de electroforesis, la expresión de Grp78/Bip y Grp94 (fig.R.1.A). En las mismas condiciones cuantificamos la viabilidad de los cultivos por el ensayo MTT (fig.R.1.B).

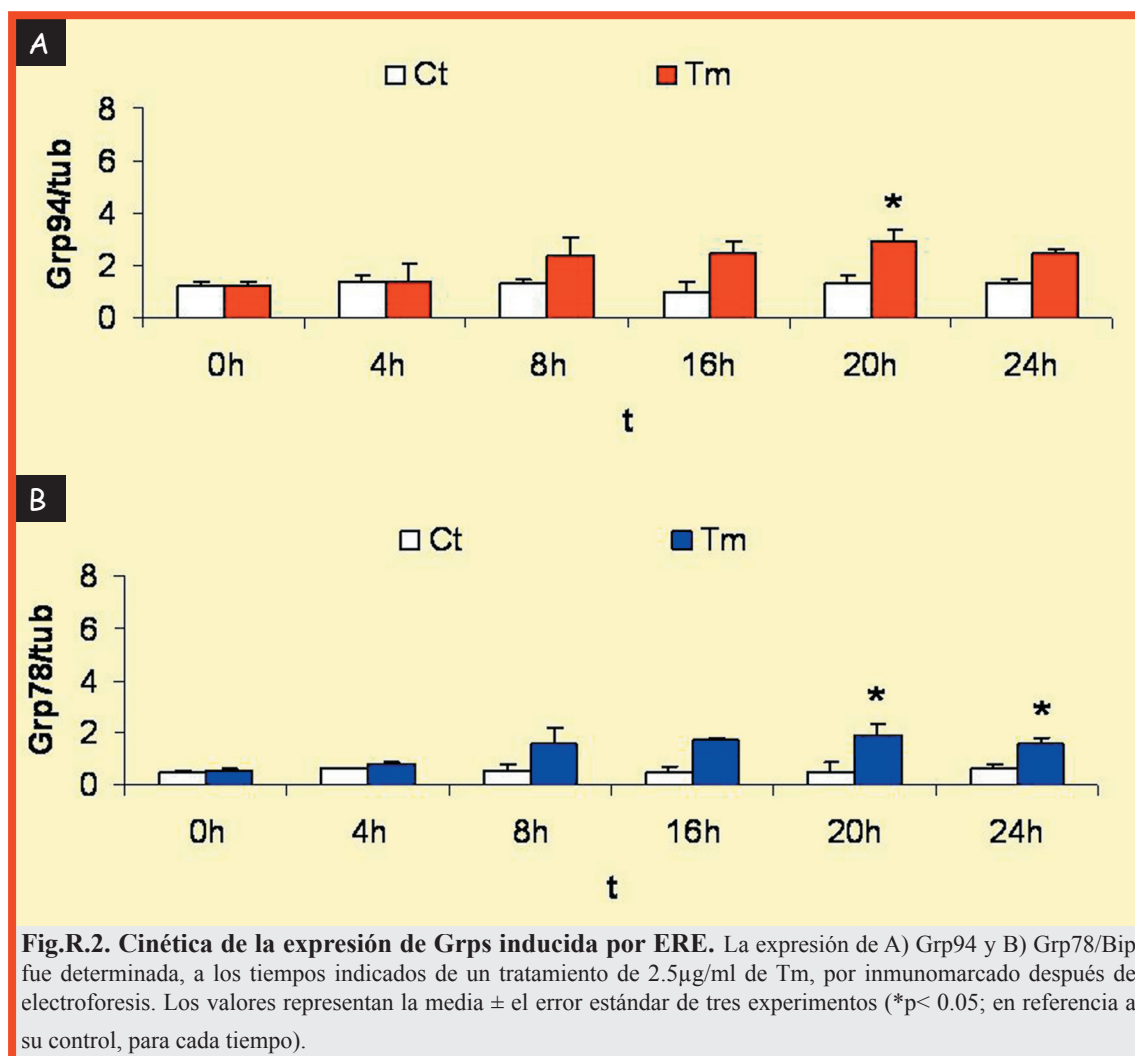
En la fig.R.1. panel A, se muestra la media de los valores de densitometrado de las bandas (Grps) de diferentes experimentos, donde se aprecia que concentraciones mayores de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  para Tm y de 0.625  $\mu\text{M}$  para Tg inducen significativamente la expresión de las dos chaperonas. En el panel B de la misma figura, podemos observar que el porcentaje de reducción de MTT disminuye significativamente a concentraciones mayores de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de Tm, produciendo una bajada de un 20% en el % de reducción de MTT con 10  $\mu\text{g/ml}$  de Tm. En los tratamientos con Tg, el porcentaje de reducción de MTT sólo disminuyó de forma significativa a la concentración de 5  $\mu\text{M}$ .



**Fig.R.1. Expresión de Grp78/Bip y Grp94 y daño celular inducidos por ERE.** A) Las células SKNMC fueron incubadas a las concentraciones indicadas de tunicamicina (Tm) y de tapsigargina (Tg) durante 18h de tratamiento y, los lisados celulares, analizados por inmunomarcado después de electroforesis proteica. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de nueve experimentos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; frente al control en el test de T student). B) Las células tratadas a las mismas concentraciones de Tm y Tg fueron analizadas por el ensayo de reducción de MTT (apartado 4.5 de Materiales y Métodos). Los valores fueron expresados como la densidad óptica a 570nm relativa a la del control. Las barras indican el error estándar de la media de seis experimentos (\* $p < 0.05$ , al comparar con el cultivo control).



En las células SKNMC, era más significativa la correlación del daño celular con la expresión de Grps en los tratamientos con Tm que con Tg. A la vista de los resultados fijamos la concentración de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de Tm para 18h de incubación, como la idónea para nuestro modelo de ERE, puesto que en estas condiciones no se observaba una bajada significativa de la viabilidad y sí un incremento significativo en la expresión de las Grps. Posteriormente, analizamos la variación de las proteínas (Grps) a lo largo del tiempo de incubación de Tm, y como se puede ver en la fig.R.2., encontramos que existe un incremento de la expresión de las Grps con el tiempo de incubación, siendo alrededor de 20h el punto de máxima expresión.

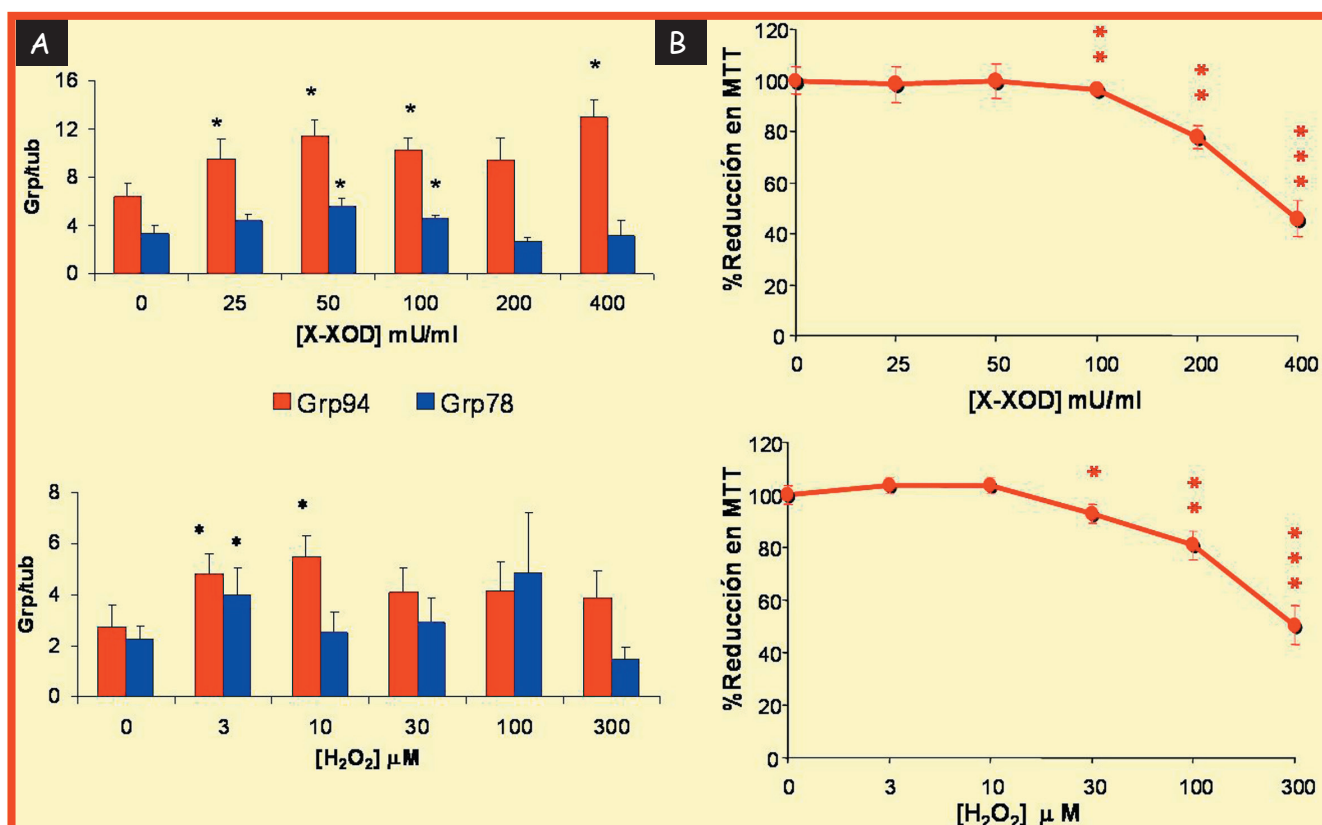


#### 4.1.2. Modelo celular de EO.

Para inducir estrés oxidativo (EO) tratamos las células con el sistema xantina (X)/xantina oxidasa (XOD) que produce aniones superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Dreher y Junod, 1995); alternatively utilizamos peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). En todos los casos analizamos, de una manera similar al modelo celular de ERE, la expresión de Grp78/Bip y Grp94, así como la viabilidad celular por ensayo de MTT después de la exposición a los diferentes tratamientos de EO.

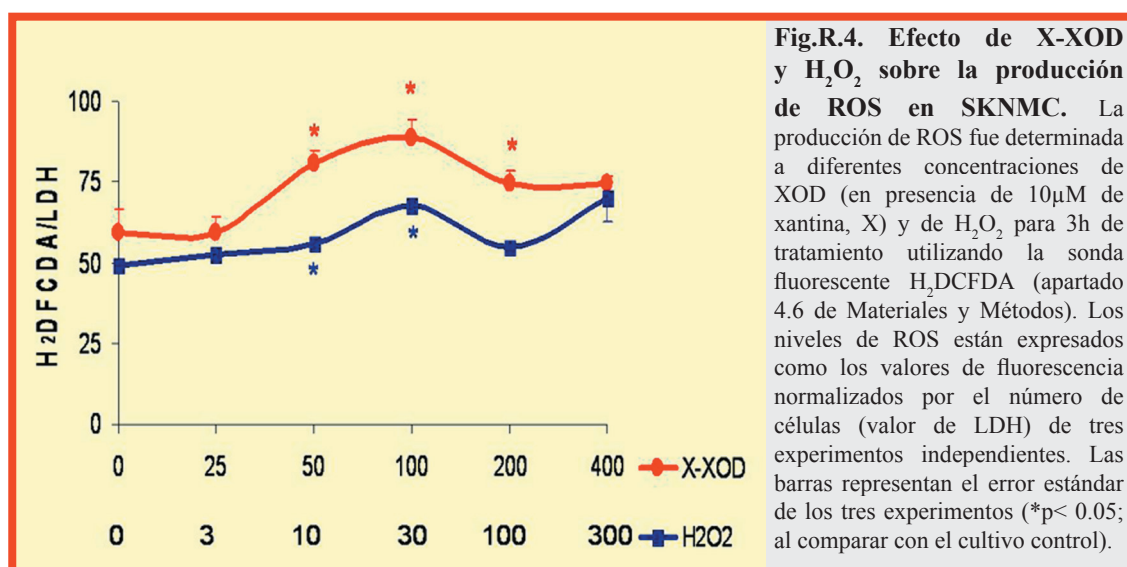
En la fig.R.3. panel A, se muestra la media de valores de densitometrado de los diferentes experimentos de inmunomarcado después de electroforesis, donde podemos apreciar un incremento significativo en la expresión de las Grps con concentraciones de 50 y 100 mU/ml de XOD, así como a 3 y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En el panel B de la fig.R.3. se muestra que, en los tratamientos con EO, el porcentaje de reducción de MTT disminuye significativamente a concentraciones mayores de 50 mU/ml para XOD y de 10  $\mu\text{M}$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La exposición de las células a estos dos tratamientos produce daño celular, y otra vez, se puede observar una correlación con la inducción en la expresión de Grps.





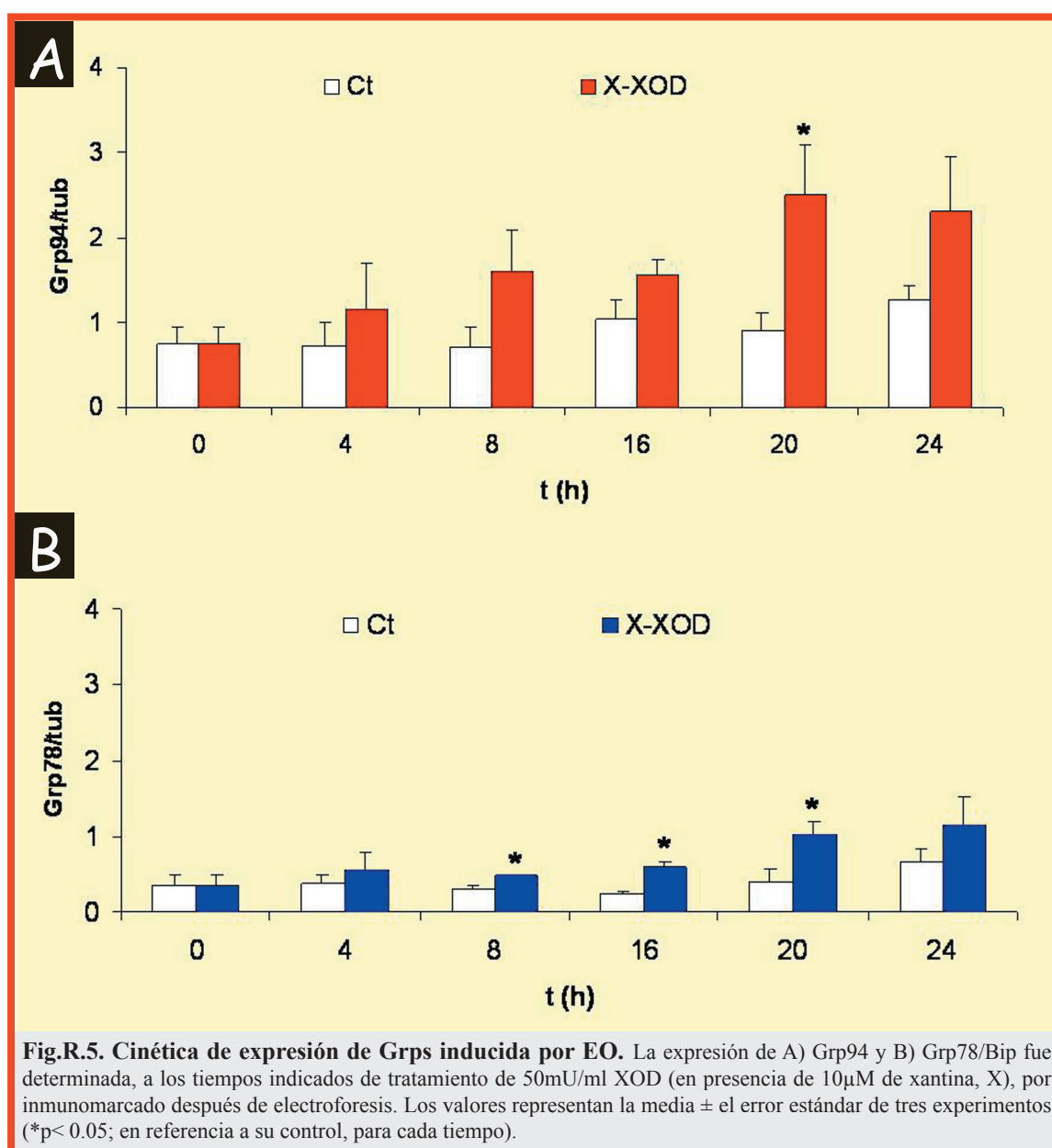
**Fig.R.3. Expresión de Grp78/Bip y Grp94, y daño celular inducidos por EO.** A) Las células SKNMC fueron incubadas con el sistema xantina/xantina oxidasa (X-XOD) a las concentraciones indicadas de xantina oxidasa (y siempre a una concentración fija de 10 μM de xantina, X) y también con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); en ambos casos el tiempo de incubación fue de 18h. Los lisados celulares fueron analizados por inmunomarcado después de electroforesis proteica. Los valores representan la media ± el error estándar de 10 experimentos (\*p< 0.05; frente al control en el test de T student). B) Las células tratadas a las mismas concentraciones de X-XOD y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron analizadas por el ensayo de reducción de MTT. Los valores fueron expresados como la densidad óptica a 570nm relativa a la del control. Las barras indican el error estándar de la media de seis experimentos (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; al comparar con el cultivo control).

En algunos estudios se ha implicado a las especies reactivas de oxígeno (ROS) como un factor patogénico en diferentes tejidos y células, así como en neuronas (Whittemore y cols., 1995). Con el fin de caracterizar la producción de ROS en las células SKNMC expuestas a EO, determinamos los niveles de ROS después de 3h de incubación con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de X-XOD (siempre a una concentración fija de 10 μM de xantina, X). Los valores se representan como la cantidad de fluorescencia de la sonda H<sub>2</sub>DCFDA normalizada por el número de células (absorbancia de LDH). Como podemos ver en la fig.R.4., la producción de ROS es significativa a concentraciones de 50, 100 y 200 mU/ml para XOD; y de 10 y 30 μM para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Nuestros resultados demostraban que el sistema X-XOD era más controlable que el tratamiento con  $H_2O_2$ , lo que podría deberse a una liberación de aniones superóxido más sostenida en el tiempo. Así, con el sistema X-XOD la célula parece tener más posibilidades de respuesta a estrés que con  $H_2O_2$ . A la vista de los resultados, establecimos la concentración óptima de XOD (50mU/ml), siempre en presencia de 10 $\mu$ M de xantina (concentración optimizada en la tesina (Vicente, 2002)), a la que las células respondían con una señal de estrés sin producir un descenso significativo en la viabilidad celular.

Para seguir la variación con el tiempo de la expresión de las Grps cuando lo que producíamos era EO, realizamos una cinética incubando las células a la concentración óptima del sistema X-XOD. Como se puede observar en la fig.R.5., la expresión de las Grps aumentaba a lo largo del tiempo, siendo alrededor de 20h el punto de máxima expresión.



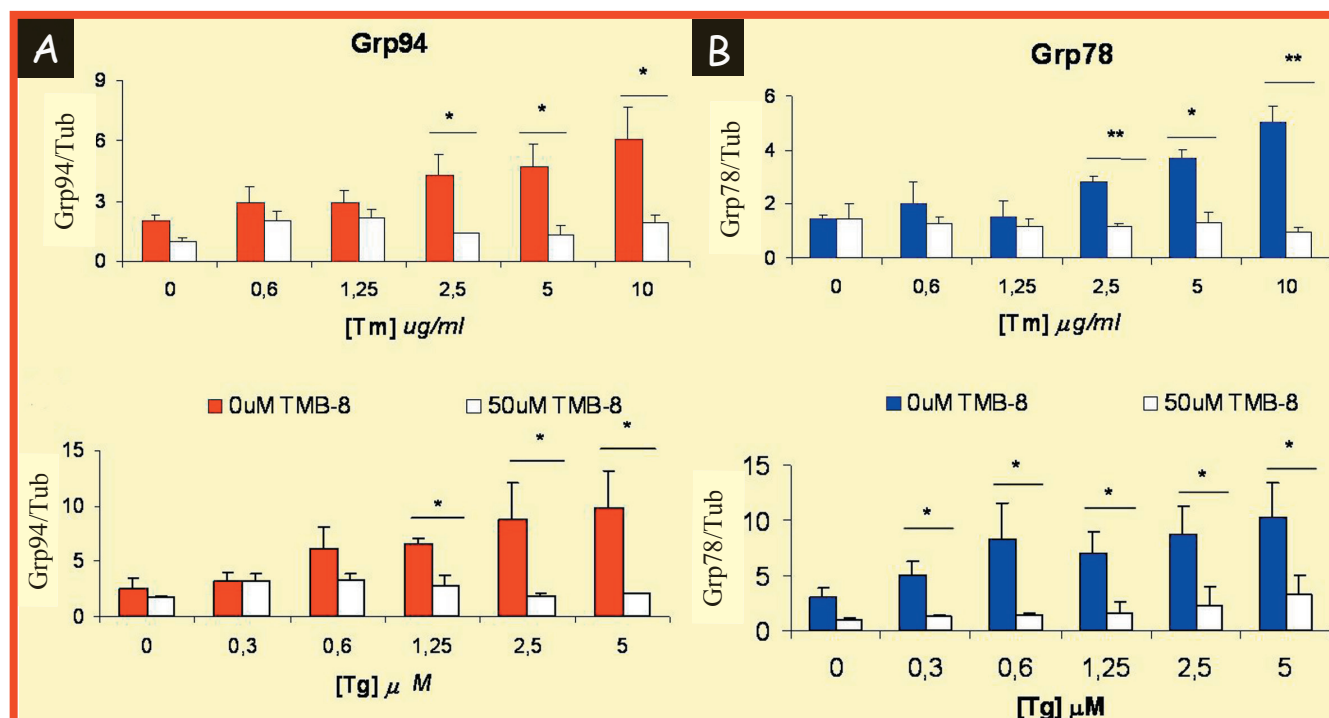
#### 4.1.3. Implicación del $\text{Ca}^{2+}$ en los modelos celulares de ERE y de EO.

La concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre juega un papel crucial en una gran variedad de rutas de señalización metabólicas que están implicadas en la dinámica del citoesqueleto, regulación de genes y proliferación celular (Ghosh and Greenberg, 1995). La homeostasis de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se mantiene por la acción concertada de varios transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  (bombas) localizados en la membrana del ER, la membrana mitocondrial y la membrana plasmática. Además, alteraciones en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en uno de los compartimentos celulares, puede afectar a la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en el otro. Para los estudios de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en cultivos celulares, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico puede ser modificada por 8-N,N-Dietilamino-octil-3,4,5-trimetoxibenzoato (TMB-8) que es un inhibidor de los receptores de rianodina (RyR) del RE.

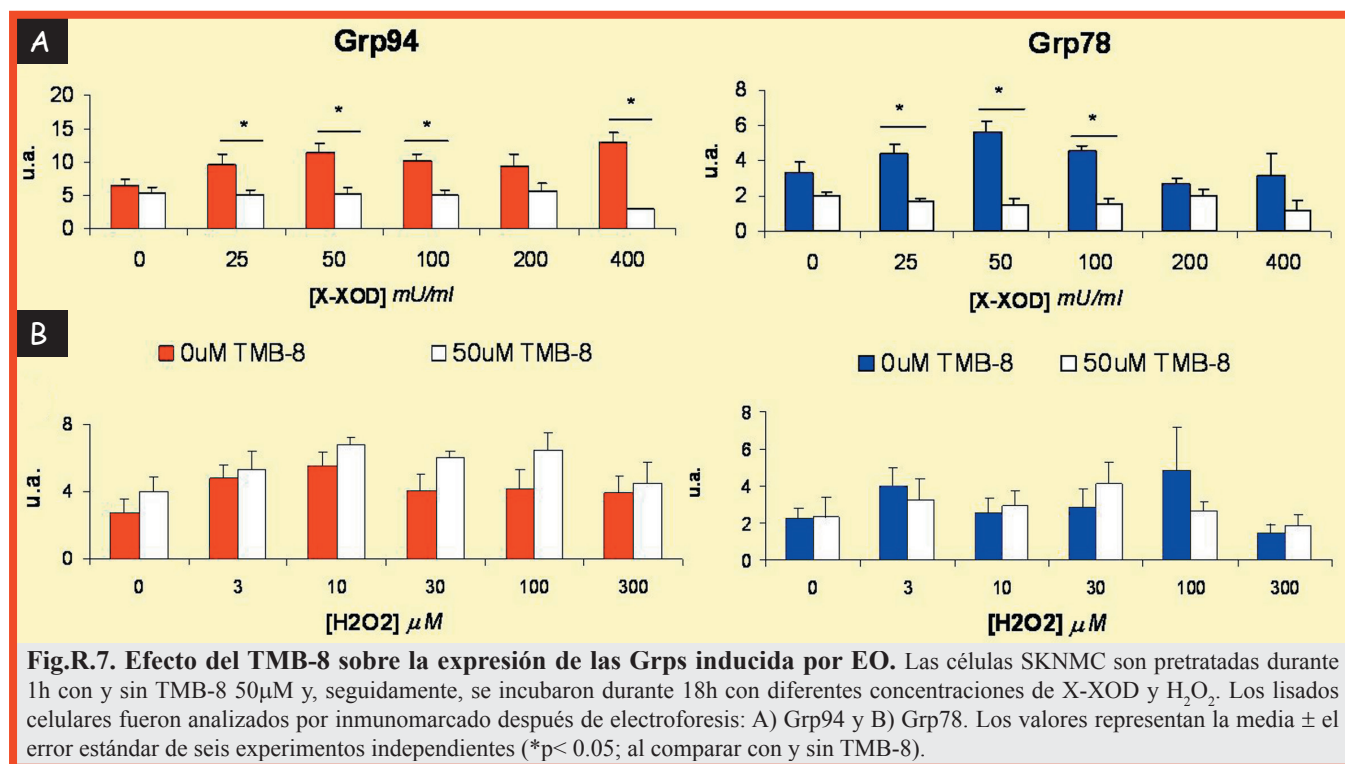
Con el fin de conocer la implicación del calcio en los modelos celulares de ERE y de EO, examinamos el efecto de TMB-8 sobre la expresión de Grps y sobre la viabilidad celular en presencia de los diferentes tratamientos.

En experimentos realizados en la tesina (Vicente, 2002), en los que se procedía a la incubación de las células durante 18h con diferentes concentraciones de TMB-8 en presencia de una concentración fija de cada uno de los tratamientos, determinamos que la concentración óptima de trabajo para el TMB-8 era 50  $\mu\text{M}$ , la cual era también capaz de inhibir la expresión de Grps.

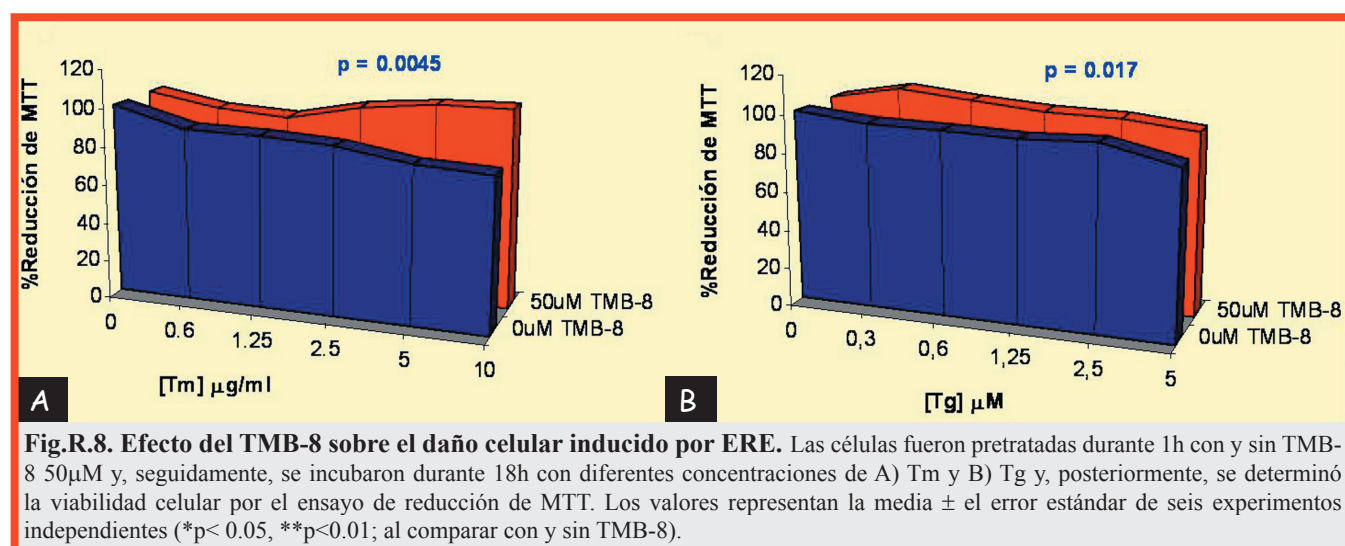
Cuando las células eran tratadas, en ausencia o presencia de TMB-8, con Tg o Tm (fig.R.6.), así como con el sistema X-XOD o con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (fig.R.7.), la inducción de la expresión de las Grps era inhibida con todos los tratamientos excepto con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Otra vez, nuestros resultados demostraban que, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no era un inductor claro y controlable de Grps. Así mismo, demostramos que la inducción de Grps en respuesta a condiciones de disfunción en el ER, así como de EO, está mediada por un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.



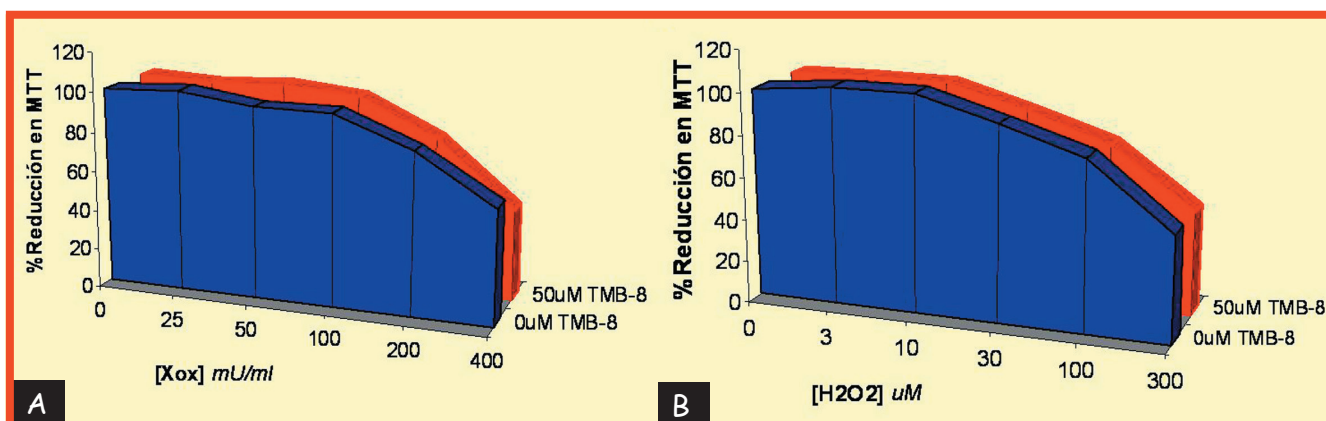
**Fig.R.6. Efecto del TMB-8 sobre la expresión de las Grps inducida por ERE.** Las células SKNMC fueron pretratadas durante 1h con y sin TMB-8 50 $\mu\text{M}$  y, posteriormente, se incubaron durante 18h con diferentes concentraciones de Tm y Tg. Los lisados celulares fueron analizados por inmunomarcado después de electroforesis: A) Grp94 y B) Grp78. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de seis experimentos independientes (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; al comparar con y sin TMB-8).



Para evaluar los efectos del quelante de Ca<sup>2+</sup> citosólico sobre la viabilidad celular, analizamos el porcentaje de reducción de MTT después de incubación con cada tratamiento en presencia o ausencia de TMB-8. Con Tm el porcentaje de reducción de MTT era revertido a niveles control (100%), en el caso de la Tg este mismo porcentaje, que estaba menos alterado que con Tm, también era revertido a niveles control (fig.R.8.). El TMB-8 no fue capaz de revertir la disminución en el porcentaje de reducción de MTT producida por X-XOD ó por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (fig.R.9.). Es decir, la viabilidad celular es recuperable con ERE por pretratamiento con TMB-8, sin embargo, con EO no se ve modificada por la inhibición de la salida de Ca<sup>2+</sup> del RE producida por el TMB-8.

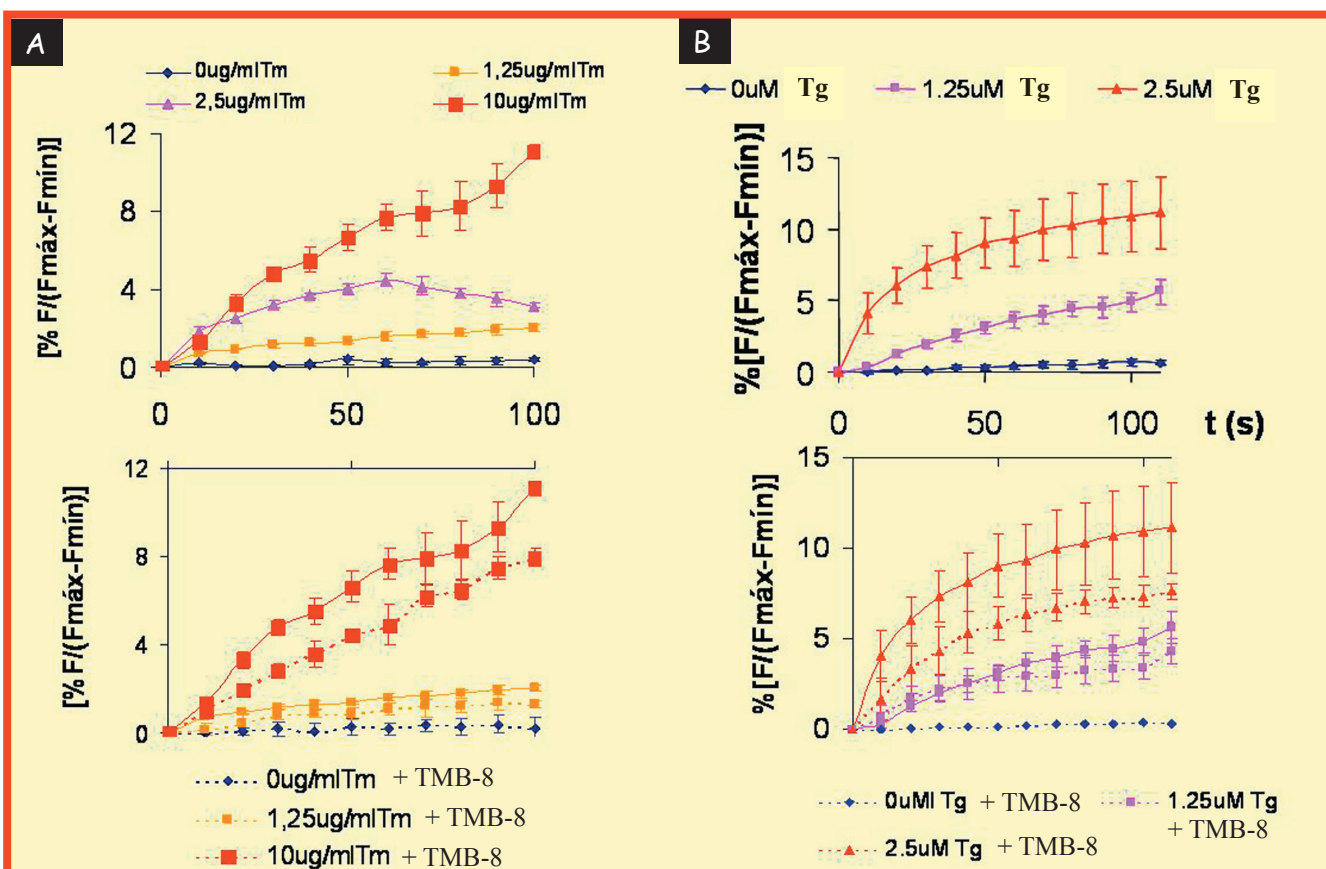




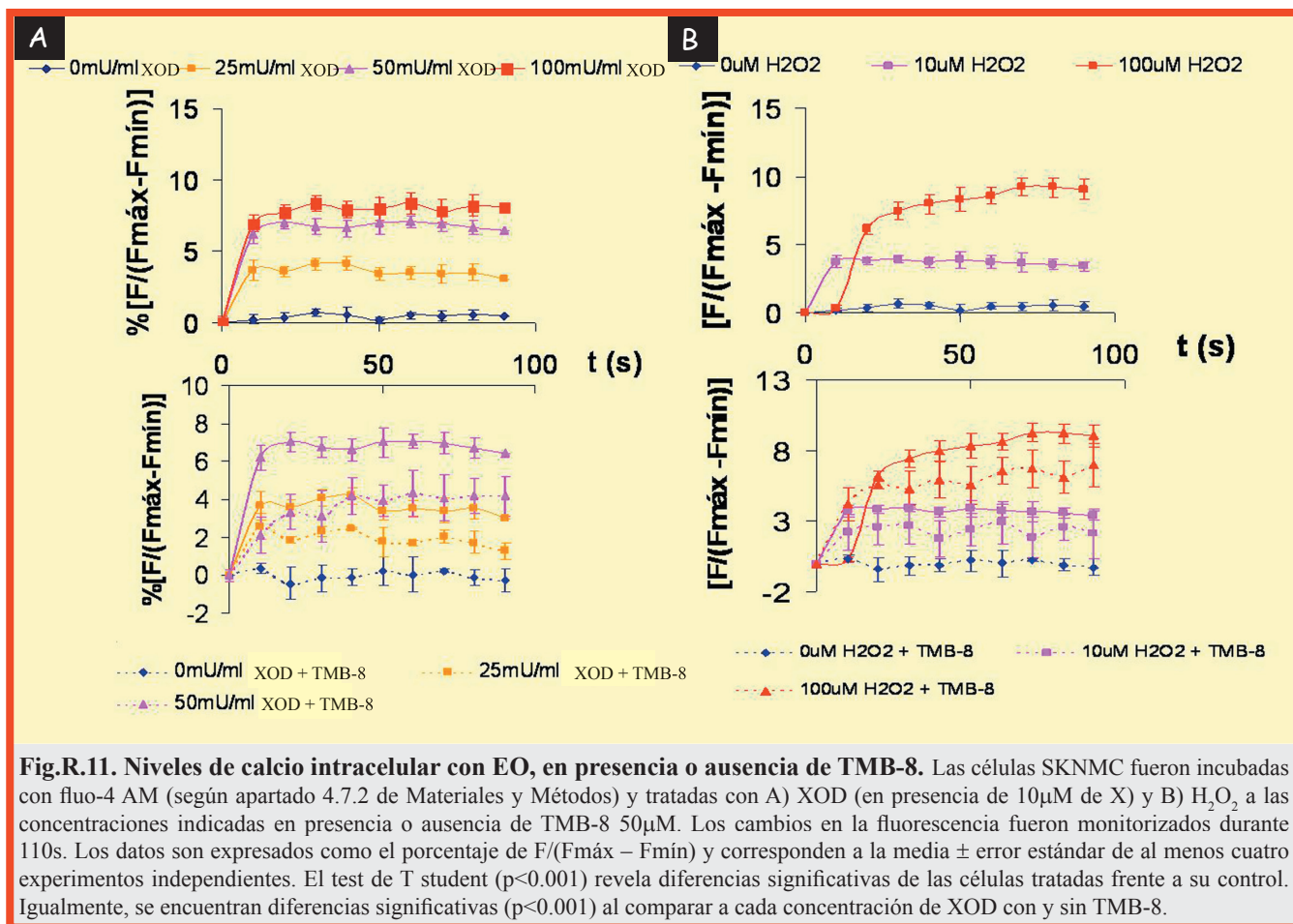


**Fig.R.9. Efecto del TMB-8 sobre el daño celular inducido por EO.** Las células fueron pretratadas durante 1h con y sin TMB-8 50μM y, seguidamente, se incubaron durante 18h con diferentes concentraciones de A) XOD (en presencia de 10μM de X) y B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y, posteriormente, se determinó la viabilidad celular por el ensayo de reducción de MTT. Los valores representan la media ± el error estándar de seis experimentos independientes (\*p< 0.05; al comparar con y sin TMB-8).

Para analizar más en profundidad la implicación del Ca<sup>2+</sup> en los modelos de ERE y de EO, realizamos la medida del Ca<sup>2+</sup> citosólico libre. En la fig.R.10 podemos ver un incremento significativo, dependiente de concentración, en los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico tanto si tratamos las células con Tm como con Tg. Además, encontramos una reducción significativa de los niveles de Ca<sup>2+</sup> inducidos por ERE cuando los cultivos han sido pretratados con TMB-8. En el caso de los tratamientos de EO (fig.R.11.), se puede observar un incremento significativo, dependiente de concentración, en los niveles del Ca<sup>2+</sup> citosólico tanto con el sistema X-XOD como con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; además, el TMB-8 redujo significativamente el incremento en el Ca<sup>2+</sup> citosólico inducido por X-XOD.



**Fig.R.10. Niveles de calcio intracelular con ERE, en presencia o ausencia de TMB-8.** Las células SKNMC fueron incubadas con fluo-4 AM (según apartado 4.7.2 de Materiales y Métodos) y tratadas con A) Tm y B) Tg a las concentraciones indicadas en presencia o ausencia de TMB-8 50μM. Los cambios en la fluorescencia fueron monitorizados durante 110s. Los datos son expresados como el porcentaje de F/(F<sub>máx</sub> - F<sub>mín</sub>) y corresponden a la media ± error estándar de al menos cuatro experimentos independientes. El test de T student (p<0.001) revela diferencias significativas de las células tratadas frente a su control. Igualmente, se encuentran diferencias significativas (p<0.001) al comparar a cada concentración con y sin TMB-8.



Nuestros resultados indican que la inducción de la expresión de Grps correlaciona con la viabilidad neuronal bajo condiciones de disfunción de ER así como en EO, y que esta respuesta neuronal es dependiente en los dos tipos de estrés de la variación en la concentración del Ca<sup>2+</sup> citosólico. Además, la pérdida de viabilidad celular es solamente recuperable por el inhibidor de un canal de salida de Ca<sup>2+</sup> del ER en condiciones de estrés específica de ER, pero no con el EO.

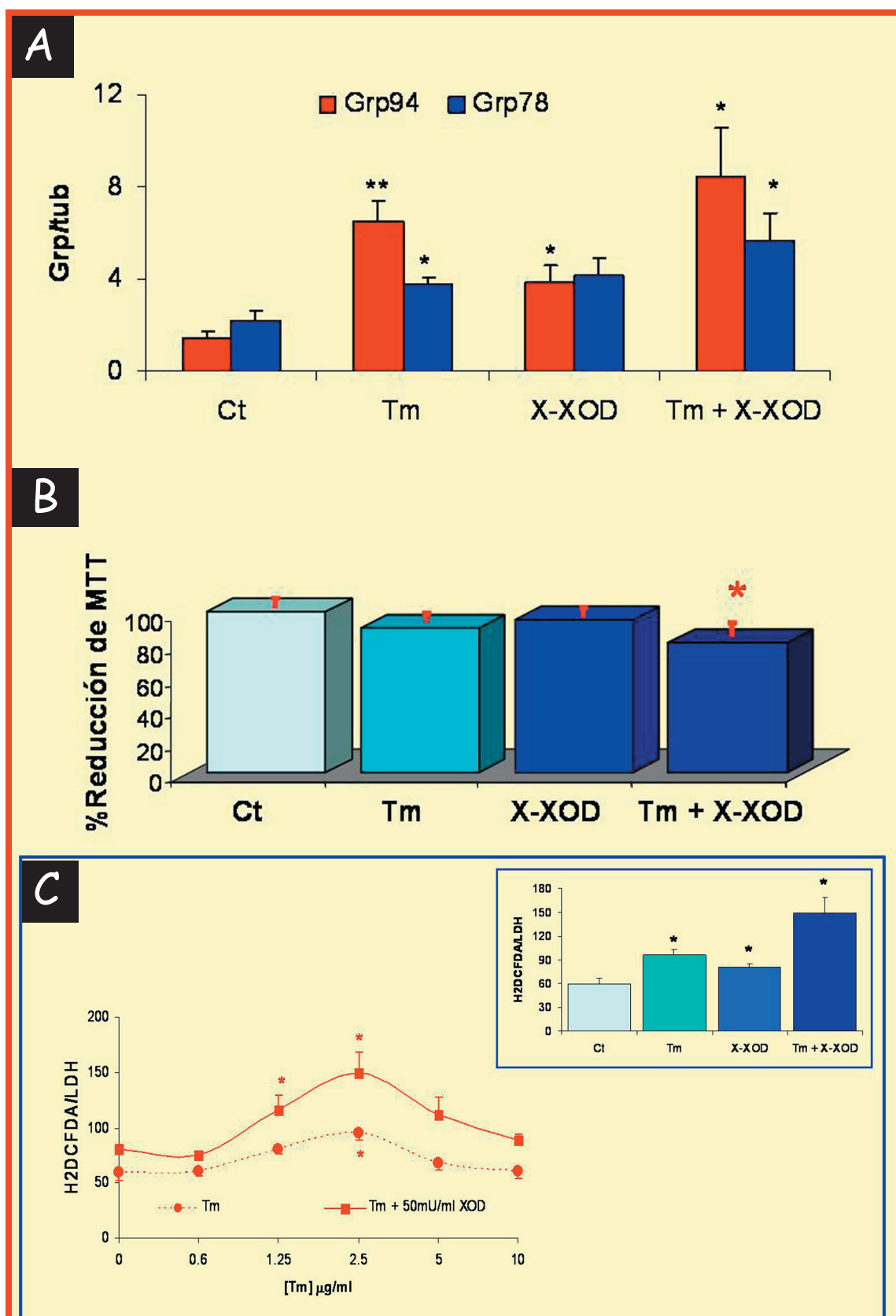
#### 4.1.4. Modelo celular de convergencia de ERE y EO.

##### 4.1.4.1. Expresión de Grps, viabilidad celular y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Una vez establecidos los modelos de ERE y de EO, caracterizamos el modelo celular de coexistencia de ambos tipos de estrés en la línea de SKNMC utilizando las medidas de expresión de las Grps, la viabilidad celular y la producción de ROS (fig.R.12.). Para los experimentos en este modelo celular, establecimos las concentraciones fijas de cada inductor de estrés para 18h de incubación, descritas anteriormente en los apartados 1.1.1 y 1.1.2.

Nosotros establecimos que 2,5 μg/ml de Tm en presencia de 10 μM de xantina/50 mU/ml de XOD durante 18h inducen una expresión más alta de Grps que cada tratamiento por separado (fig.R.12.A). En los ensayos de MTT realizados para determinar la viabilidad celular, encontramos que la combinación de Tm con X-XOD, producía una mayor disminución en el porcentaje de reducción de MTT al comparar con la disminución producida por cada tratamiento individual (fig.R.12.B).

Posteriormente, se analizó la producción de ROS en las células SKNMC tratadas durante 3h con diferentes concentraciones de Tm sola o en combinación con X-XOD. Los niveles de ROS se determinaron como la cantidad de fluorescencia de la sonda H2DCFDA normalizada por el número de células (absorbancia de LDH). En los resultados que se muestran en la fig.R.12.C se puede observar un incremento significativo en la producción de ROS producida por Tm+X-XOD, tanto al comparar con X-XOD, como en relación a las diferentes concentraciones de Tm sola.



**Fig.R.12. Tm en presencia de X-XOD: expresión de Grps, viabilidad celular y producción de ROS.**

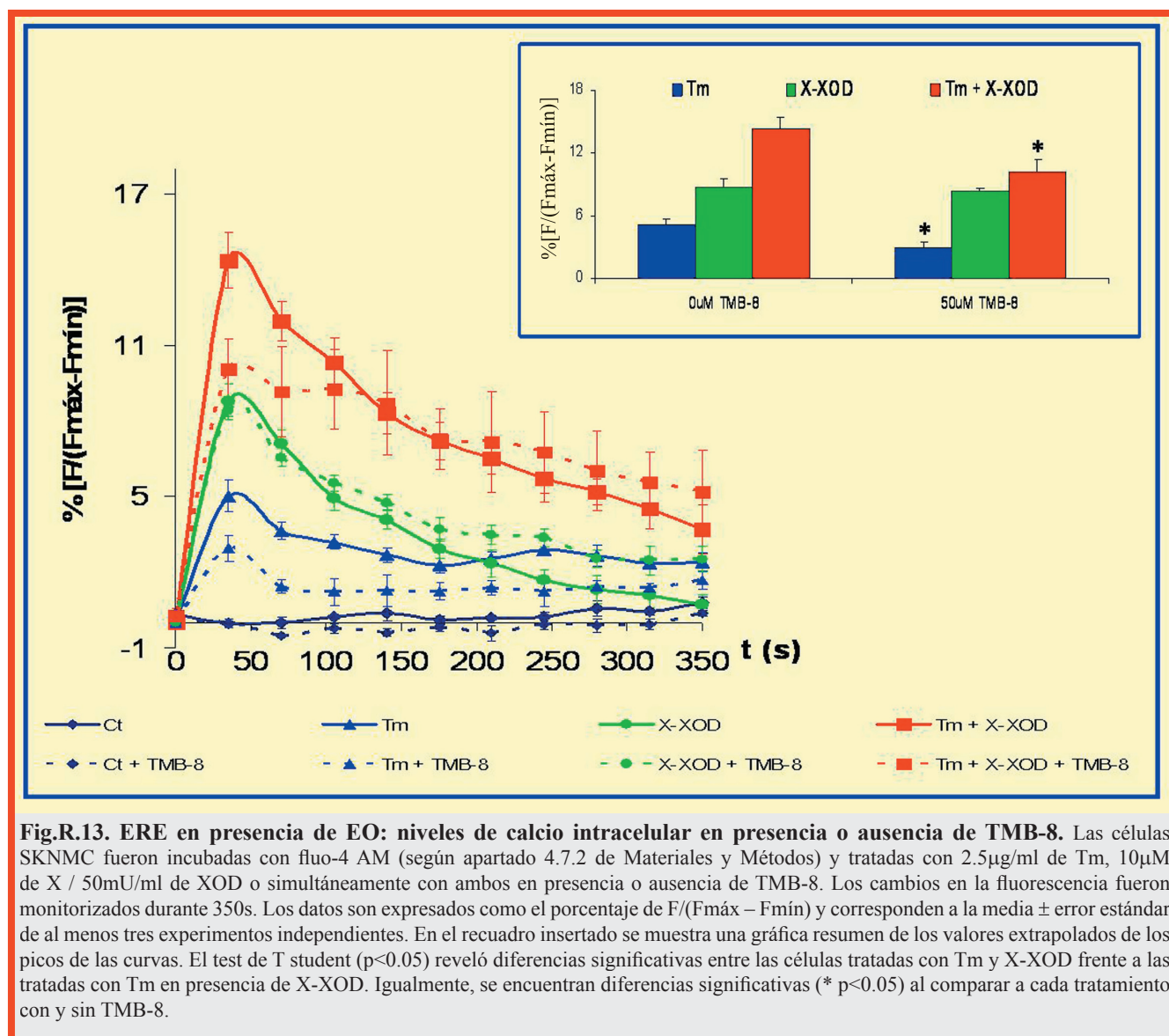
Las células SKNMC tratadas con 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de Tm, con 10  $\mu\text{M}$  de X / 50mU/ml de XOD o con ambos simultáneamente durante 18h, fueron analizadas por A) inmunomarcado después de electroforesis y B) por el ensayo de reducción de MTT. C) En los cultivos incubados durante 3h con Tm a las concentraciones indicadas, en presencia o ausencia de X-XOD, se analizó la producción de ROS (apartado 4.6 de Materiales y Métodos). Los niveles de ROS están expresados como los valores de fluorescencia normalizados por el número de células (valor de LDH) de tres experimentos independientes. Las barras representan el error estándar de los tres experimentos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; al comparar con el cultivo control). En el recuadro insertado se muestra una gráfica resumen de valores extrapolados de dichas medidas de los niveles de ROS.

Nuestros resultados revelaron que el ERE en presencia de EO produce un aumento en la inducción de la expresión de Grps y en la pérdida de viabilidad neuronal, así como un aumento en la producción de ROS, en referencia a los modelos individuales de ERE y EO.

#### 4.1.4.2. Implicación del $\text{Ca}^{2+}$ en el modelo de convergencia de estreses.

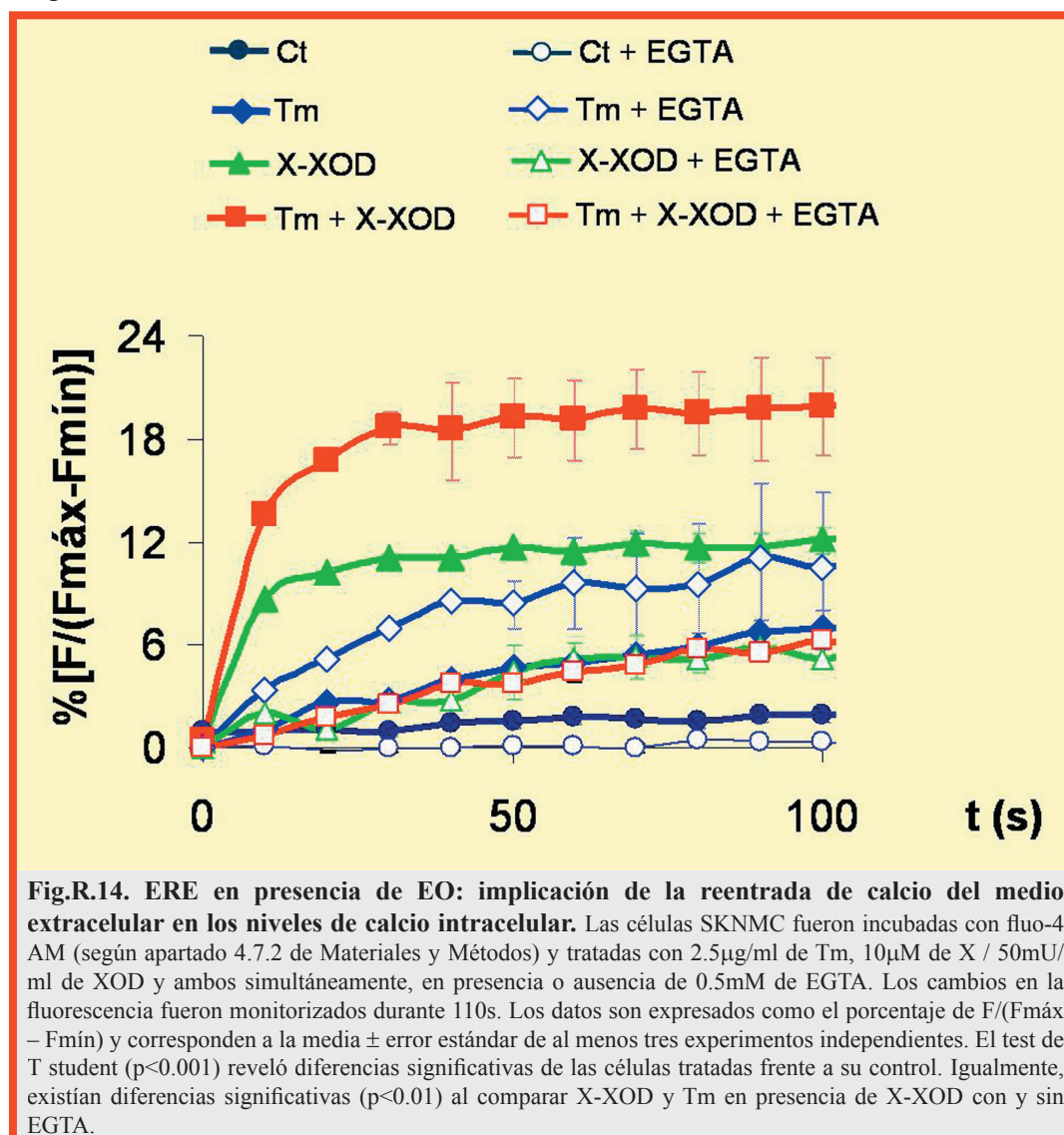
El  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel importante en la señalización celular, e incrementos en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico están ligados tanto a muerte como a supervivencia (Mattson y cols., 1993; Paschen, 2000; Webb and Miller, 2003). Puesto que incrementos en la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico estaban implicados en los modelos de ERE y EO, nos planteamos estudiar la señalización de la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  en dichos modelos; así como en el modelo de coexistencia de estreses.

En condiciones experimentales similares que las de los modelos de EO y ERE, analizamos los niveles de calcio citosólico en el modelo de coexistencia de estreses, pero realizando registros a tiempos más largos en los que medíamos la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  cada 35 segundos (fig.R.13) hasta los 350 segundos. Encontramos, que la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  era mayor cuando coexistían los dos estreses y que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en Tm y en la coexistencia de los dos estreses (Tm + X-XOD) bajaba, pero nunca a los niveles control, manteniendo constante una pequeña liberación del  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, pudimos observar una reducción significativa de los picos de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando las células eran pretratadas con TMB-8, para Tm y Tm + X-XOD.

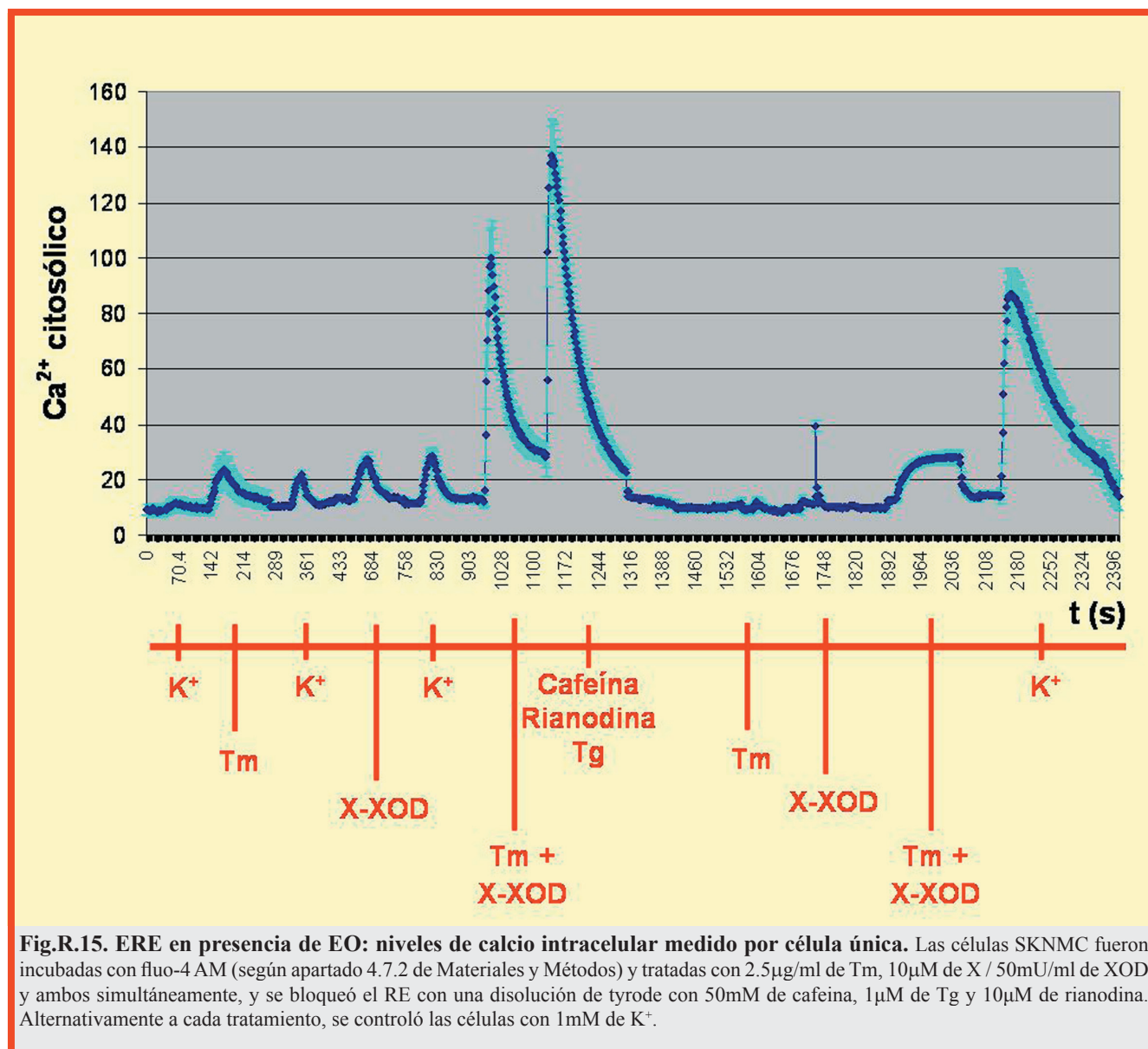




Como el tampón tyrode utilizado en las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico lleva cloruro cálcico ( $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ), analizamos la implicación que tenía la reentrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular; para ello cultivamos en paralelo las células SKNMC en tyrode con y sin  $\text{Ca}^{2+}$ , y en presencia o ausencia de un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  (el ácido etilen-glicol-bis( $\beta$ -aminoetil eter) N,N,N',N'-tetraacético, EGTA). Como se observa en la fig.R.14, dada la reducción de la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, la reentrada del  $\text{Ca}^{2+}$  del medio juega un papel muy importante, tanto en el modelo de X-XOD como en el de coexistencia de los dos estreses ( $\text{Tm} + \text{X-XOD}$ ). Sin embargo, en el caso de Tm sólo, hay una mayor salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de los diferentes orgánulos implicados.

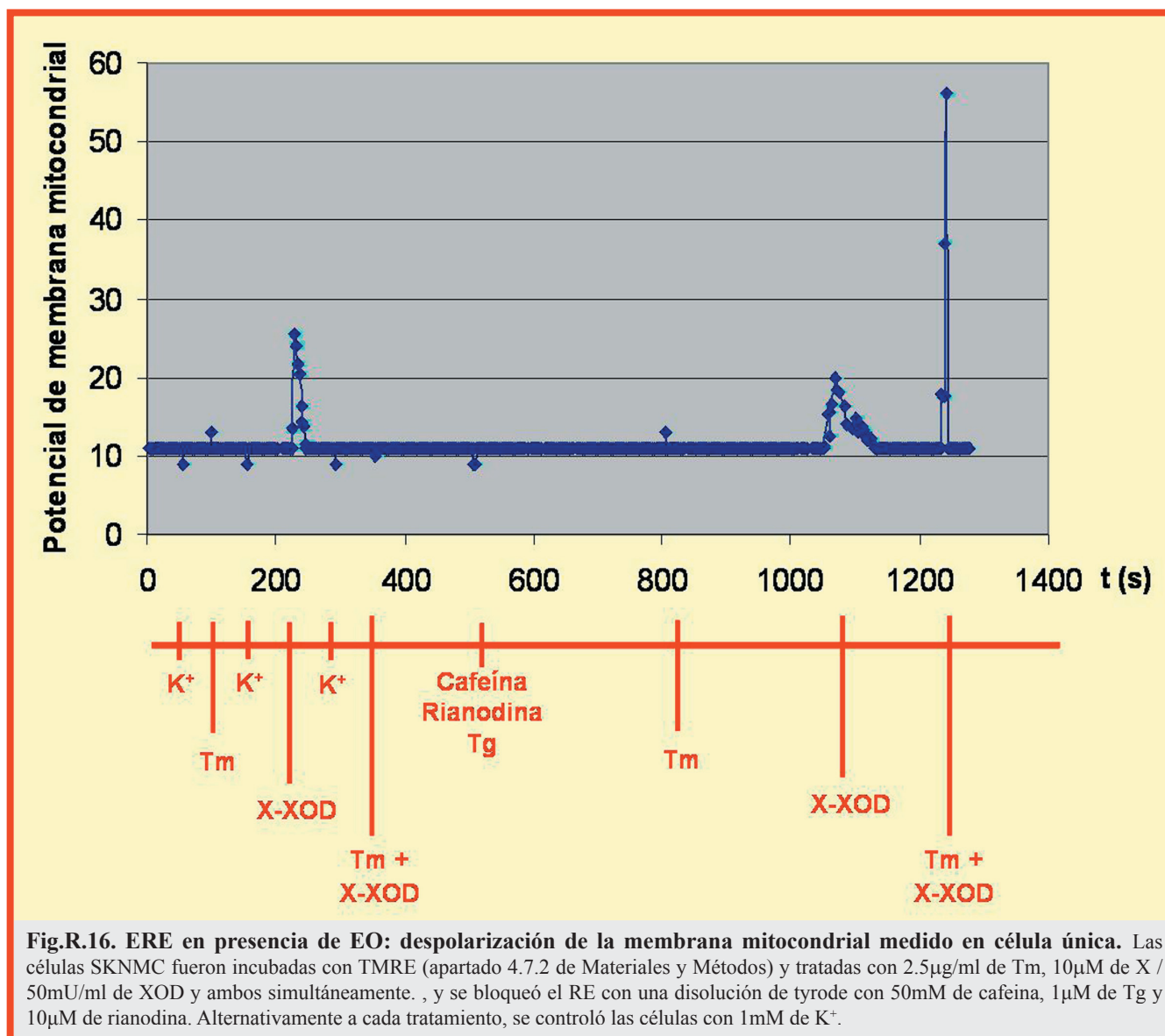


A la vista de los resultados y para analizar el papel que jugaba la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE en cada uno de nuestros modelos, realizamos experimentos con fluo-4 en célula única, bloqueando el RE con un cóctel de cafeína, rianodina y tapsigargina. Con la cafeína y la rianodina vaciamos el  $\text{Ca}^{2+}$  del RE por activación de los dos tipos de receptores (InsP3R y RyR) que controlan la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, y con la tapsigargina aseguramos que ese  $\text{Ca}^{2+}$  no vuelva a entrar por el bloqueo de las bombas SERCA. Como podemos observar en la figura R.15, en los tres tratamientos se produce una salida de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol, siendo mucho mayor en ERE+EO. Cuando vaciamos el RE de  $\text{Ca}^{2+}$ , podemos ver que: en el caso de Tm el pico de  $\text{Ca}^{2+}$  desaparece cuando bloqueamos el RE, mientras que para X-XOD el pico de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta y para la coexistencia de estreses ( $\text{Tm} + \text{X-XOD}$ ) esta señal se reduce considerablemente. Estos resultados indicaban que la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  estaba totalmente controlada por el RE en el caso de la Tm y, sólo en parte, con la combinación de estreses. Sin embargo, en X-XOD la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE juega un papel muy pequeño, y seguramente sea otro orgánulo celular el implicado en esta liberación. Además este orgánulo o compartimento aumenta su liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando bloqueábamos el RE.



#### 4.1.4.3. Variación del potencial de membrana mitocondrial en el modelo de convergencia de estreses.

Una vez estudiado el papel que jugaba la liberación del Ca<sup>2+</sup> del RE en nuestros modelos celulares, y puesto que está descrito que el EO actúa más directamente sobre la mitocondria (Richter, 1995), decidimos analizar la posible variación del potencial de membrana mitocondrial. Para dicho fin se realizaron experimentos en célula única con la sonda TMRE, que mide la despolarización de la membrana mitocondrial, siguiendo un protocolo similar al análisis de Ca<sup>2+</sup> citosólico en el que se utilizaba el cóctel bloqueante del RE. Como se observa en la figura R.16, la Tm no afecta en ningún caso (antes o después del bloqueo del RE) al potencial de membrana mitocondrial, mientras que la X-XOD si afecta en todos los casos, reduciendo su intensidad cuando bloqueamos el RE, pero alargando el tiempo de respuesta. En presencia de la coexistencia de estreses (Tm + X-XOD) no se produce variación en dicho potencial en condiciones normales, pero cuando bloqueamos el RE la señal es muy intensa, llegando incluso a ser el doble que la de X-XOD.



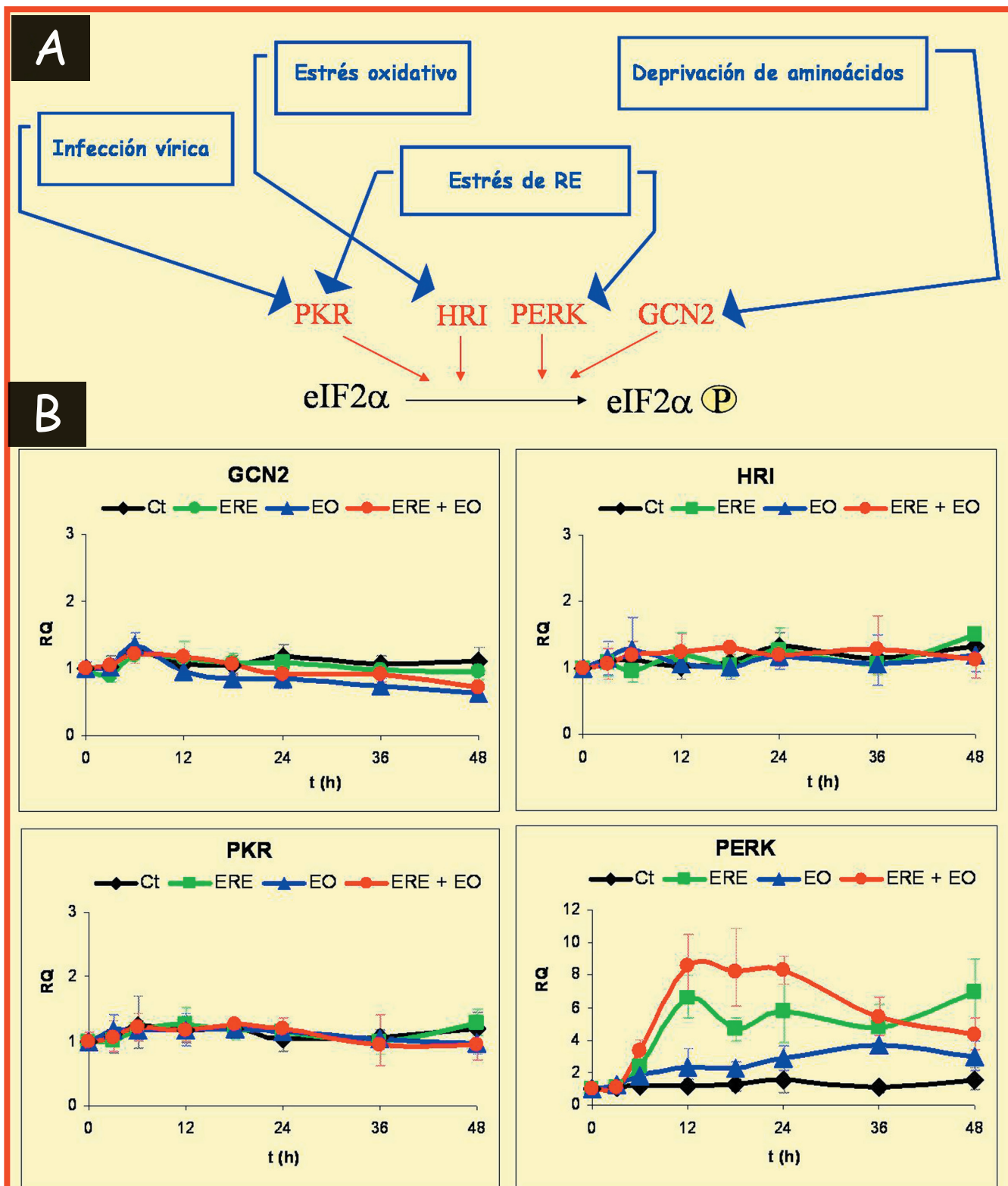
Estos resultados confirman el papel del RE en la coexistencia de estreses (Tm+X-XOD), ya que sólo se ve afectado el potencial de membrana mitocondrial cuando bloqueamos este orgánulo.

#### 4.2. RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS (RIE) EN EL MODELO CELULAR DE ERE + EO.

Recientemente se ha descrito la respuesta integrada a estrés (RIE) como una respuesta tanto de muerte como de supervivencia, en la que estarían implicados la respuesta UPR y la fosforilación reversible de eIF2α (Boyce y cols., 2005; Lu y cols., 2004). Por todo ello, nos planteamos el estudio de esta respuesta RIE en nuestros modelos celulares de EO, ERE y ERE + EO.

Hay cuatro quinasas que, dependiendo del estímulo, fosforilan el factor eIF2α; HRI – si el estímulo es EO (Han y cols., 2000), PKR – por una infección vírica, o también por algún tipo de estrés de RE (Maggi y cols., 2000), GCN2 – si el estrés es debido a privación de aminoácidos (Hinnebusch y cols., 1996), y PERK – por estrés de RE (Harding y cols., 2000). Hemos estudiado en nuestros modelos celulares de estrés, la expresión de estas quinasas a nivel de transcripción haciendo un análisis de expresión génica por RT-PCR en array. En todos los casos analizamos la variación de la expresión en función del tiempo de incubación con cada tratamiento.

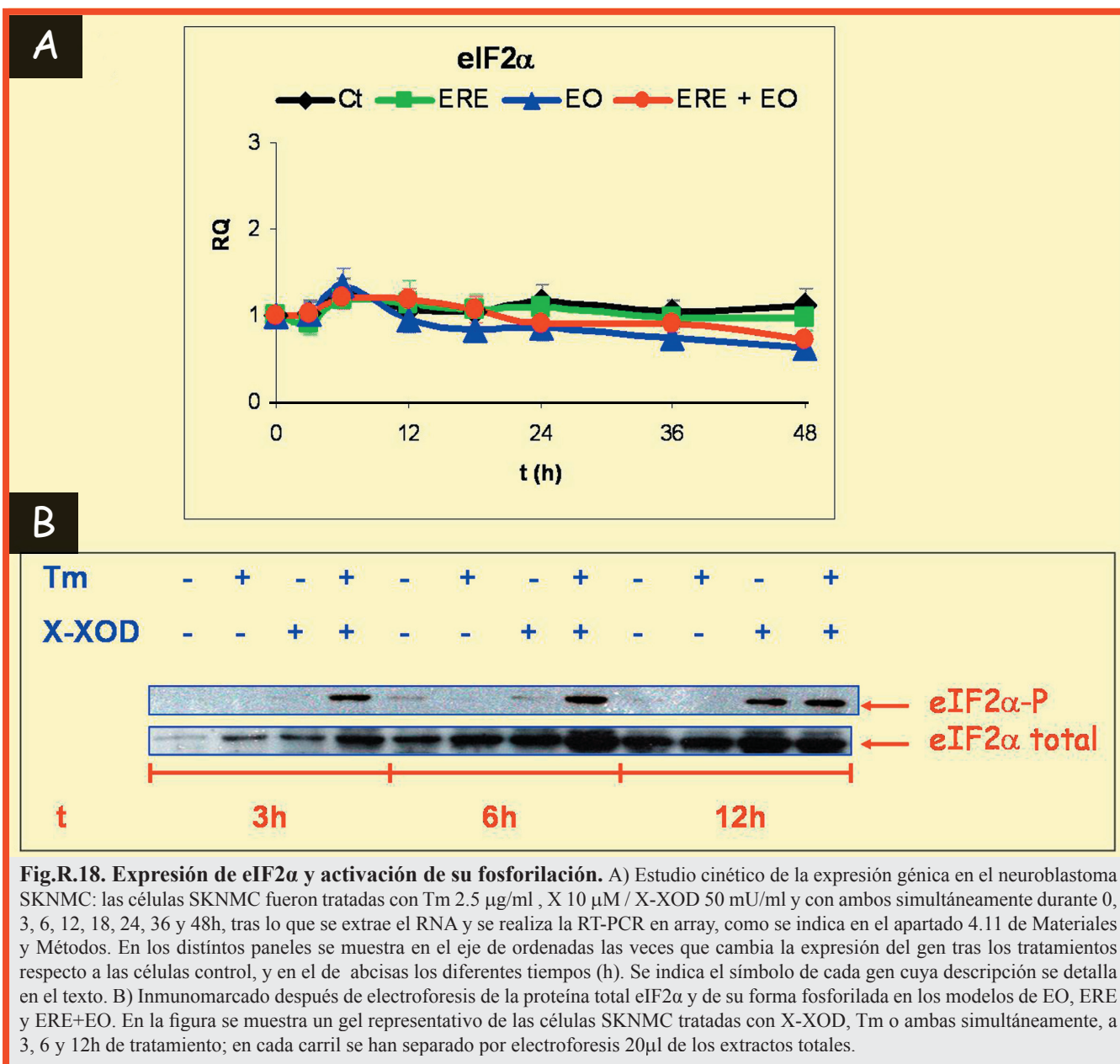
1) En la figura R.17 se representan los niveles de mRNA de las quinasas que fosforilan a eIF2 $\alpha$ , y podemos ver que varía la expresión del mRNA de PERK, en el modelo de ERE y en la coexistencia de estreses (ERE+EO); en este último caso se obtuvo una inducción del mRNA de PERK de hasta 10 respecto al control.



**Fig.R.17. Estudio cinético de la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC: quinasas que activan la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ .** A) Esquema de las quinasas que activan la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ . B) Las células SKNMC fueron tratadas con Tm 2.5  $\mu$ g/ml, X 10  $\mu$ M / X-XOD 50 mU/ml y con ambos simultáneamente durante 0, 3, 6, 12, 18, 24, 36 y 48h, tras lo que se extrae el RNA y se realiza la RT-PCR en array, como se indica en el apartado 4.11 de Materiales y Métodos. En los distintos paneles se muestra en el eje de ordenadas las veces que cambia la expresión del gen tras los tratamientos respecto a las células control, y en el de abscisas los diferentes tiempos (h). Se indica el símbolo de cada gen cuya descripción se detalla en el texto.



2) Se puede observar que la fosforilación (fig.R.18.b) empieza a producirse a las 3h de tratamiento en ERE+EO, llegando hasta las 12h, donde también aparece la banda de fosforilación de eIF2 $\alpha$  en los tratamientos con X-XOD. Tanto el mRNA (fig.R.18.a) como la proteína (fig.R.18.b) de eIF2 $\alpha$  total no varían a ninguno de los tiempos de incubación y para ninguno de los tratamientos.



La respuesta a estrés en el RE no sólo se da a través de la activación de PERK y de eIF2 $\alpha$ , sino que existen otros transductores del RE que activan dicha respuesta por vías independientes de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ : IRE1 y ATF6. Como se puede observar en la figura R.20.a, al analizar los niveles de mRNA de IRE1 y ATF6 en nuestros modelos celulares de estrés, encontramos un patrón de sobreexpresión muy parecido en los niveles de los dos genes para cada una de las condiciones de estrés; siendo la activación en EO más retrasada puesto que empiezan a incrementarse a partir de las 24h de tratamiento. Además, es muy significativo el incremento de expresión de ambos mRNAs en la combinación de estreses; IRE1 (8 veces respecto al control) y ATF6 (3 veces respecto al control), y también en referencia a los modelos individuales.

En vista de estos resultados podemos decir que en el EO, ERE y la combinación de ambos están activadas todas las vías de UPR. Todas estas vías pueden activar la supervivencia celular, que intenta rescatar a las células del estrés y recuperar los niveles normales; o bien, si la sobrecarga de proteínas no plegadas o mal plegadas en el RE no se resuelve, la activación prolongada de la UPR llevaría a la

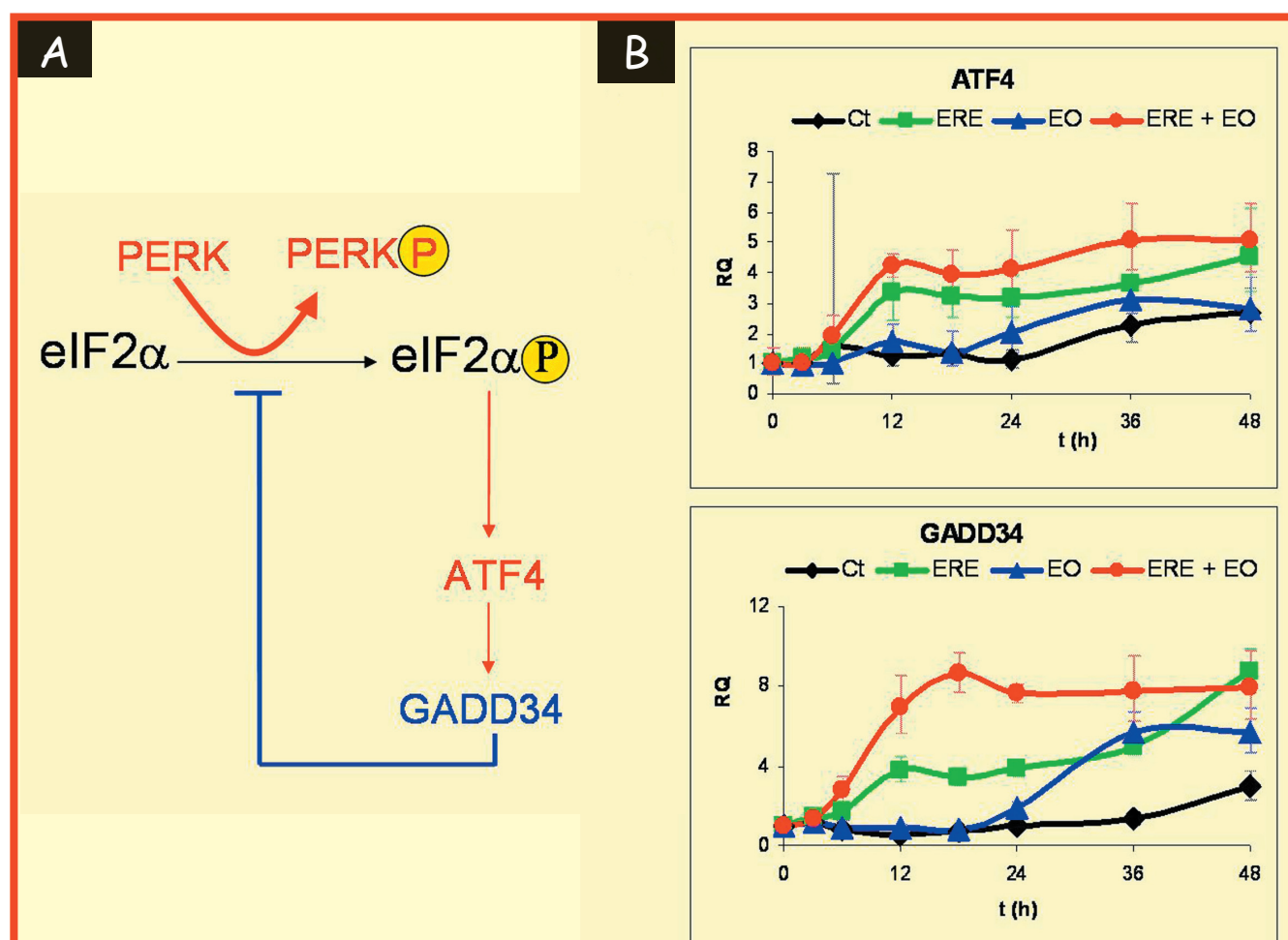
muerte celular.

#### 4.2.1. Ruta de señalización de supervivencia vía UPR.

La respuesta a estrés de RE en células eucariotas implica tres mecanismos diferentes:

##### I. Atenuación traduccional.

PERK activo fosforila la serina 51 de la subunidad  $\alpha$  de eIF2, llevando así a la inducción específica de ATF4. De esta forma, PERK contribuye a la atenuación traduccional, a la vez que activa una vía de autorregulación, donde ATF4 induce la expresión de un inhibidor de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , GADD34. En la figura R.19.B se muestran los niveles de mRNA de ATF4 y GADD34 activados por cada uno de los inductores de estrés. Como se puede observar en dicha figura, el mRNA de ATF4 se induce con ERE y con ERE+EO a partir de las 12h de tratamiento, y además la sobreexpresión es sostenida hasta las 48h para la combinación de estreses. En el caso de EO, la inducción del mRNA de ATF4 es tardía, con un punto máximo de expresión a las 36h. En la expresión de GADD34, y de manera similar a ATF4, podemos observar un máximo de activación de su mRNA a 12h, con el modelo de ERE; y a 18h, con la combinación de estreses (ERE+EO).

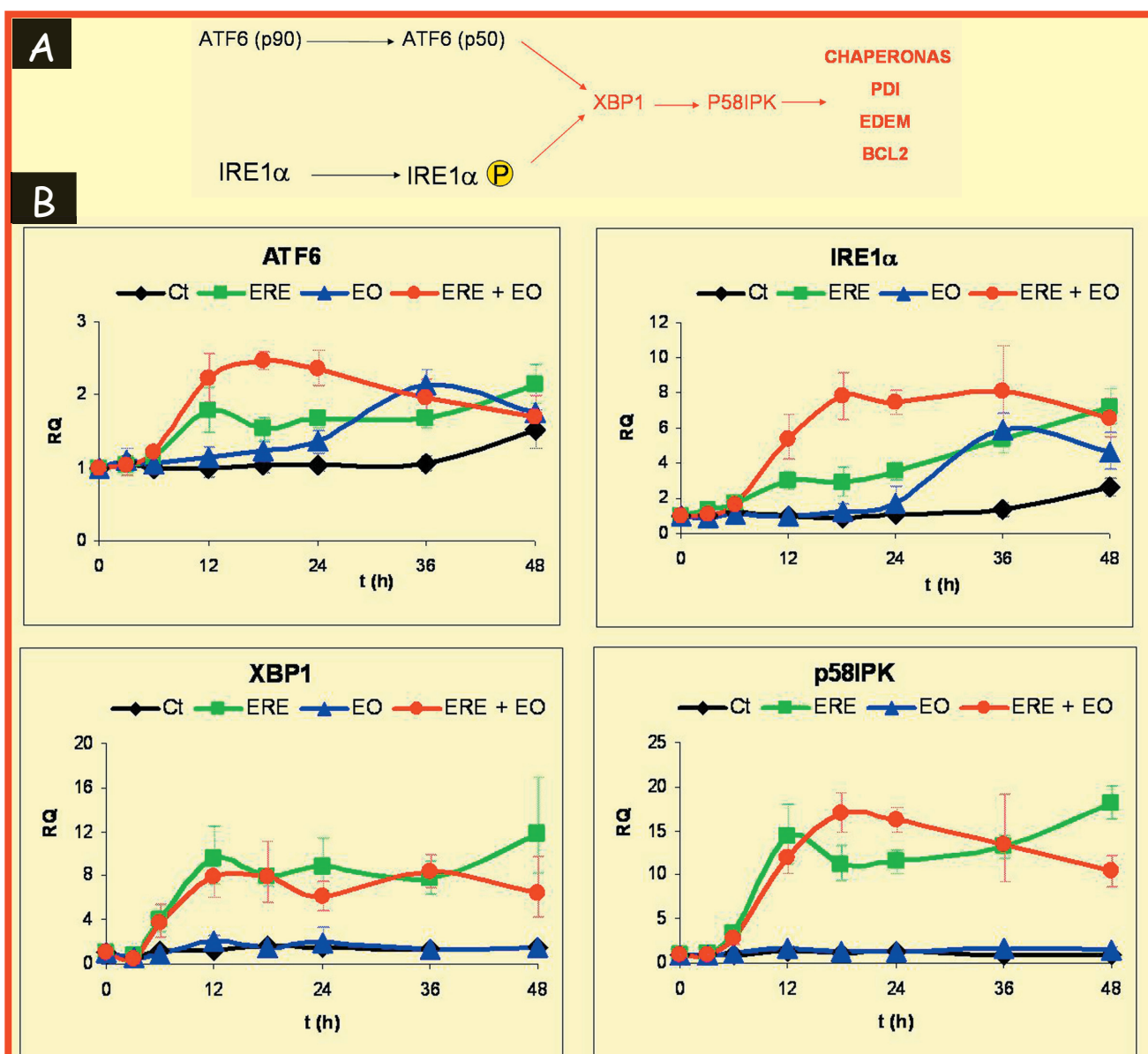


**Fig.R.19. Estudio cinético de la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC: activación de la ruta ATF4.** A) Esquema de la activación de la ruta ATF4 por la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ . B) Las células SKNMC fueron tratadas con Tm 2.5  $\mu$ g/ml, X 10  $\mu$ M / X-XOD 50 mU/ml y con ambos simultáneamente durante 0, 3, 6, 12, 18, 24, 36 y 48h, tras lo que se extrae el RNA y se realiza la RT-PCR en array, como se indica en el apartado 4.11 de Materiales y Métodos. En los distintos paneles se muestra en el eje de ordenadas las veces que cambia la expresión del gen tras los tratamientos respecto a las células control, y en el de abscisas los diferentes tiempos (h). Se indica el símbolo de cada gen cuya descripción se detalla en el texto.

##### II. Activación transcripcional.

La capacidad del RE está totalmente controlada por la inducción de una variedad de moléculas

residentes en él, incluidas las chaperonas Grp78/BiP y Grp94 (Gething and Sambrook, 1992), la chaperona reguladora del oxígeno de 150KDa (ORP150), enzimas como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) (Dorner y cols., 1990) y una proteína (DNAJB9/MDG1) que co-localiza con Grp78/Bip favoreciendo la función de éste en el plegamiento de las proteínas acumuladas en la membrana del RE (Shen y cols., 2002). Estas proteínas son inducidas a nivel transcripcional en el proceso de respuesta a mal plegamiento de proteínas (UPR), el cual está regulado por la activación y procesamiento de XBP1 que activa p58IPK (fig.R.20.A) y se une a las secuencias consenso UPRE y ERSE para activar la transcripción de esos genes. Como podemos observar en los análisis de niveles de mRNAs de los citados genes en los modelos celulares de estrés (fig. R.20.B), tanto XBP1 como p58IPK están sobreexpresados a partir de las 6h de tratamiento con ERE y ERE+EO, manteniéndose activada su expresión hasta las 48h. Si analizamos los mRNAs de BiP, Grp94/TRA1, PDI, ORP150/HYOU y MDG1 (fig.R.21.A), podemos ver que todos ellos se sobreexpresan a partir de las 6h de tratamiento con ERE y ERE+EO. Mientras que con ERE dicha sobreexpresión va a aumentar hasta 48h; con la coexistencia de estreses la más alta sobreexpresión (entre 18 y 24h) de BiP, PDI, ORP150 y MDG1 se va reduciendo hasta las 48h de tratamiento.

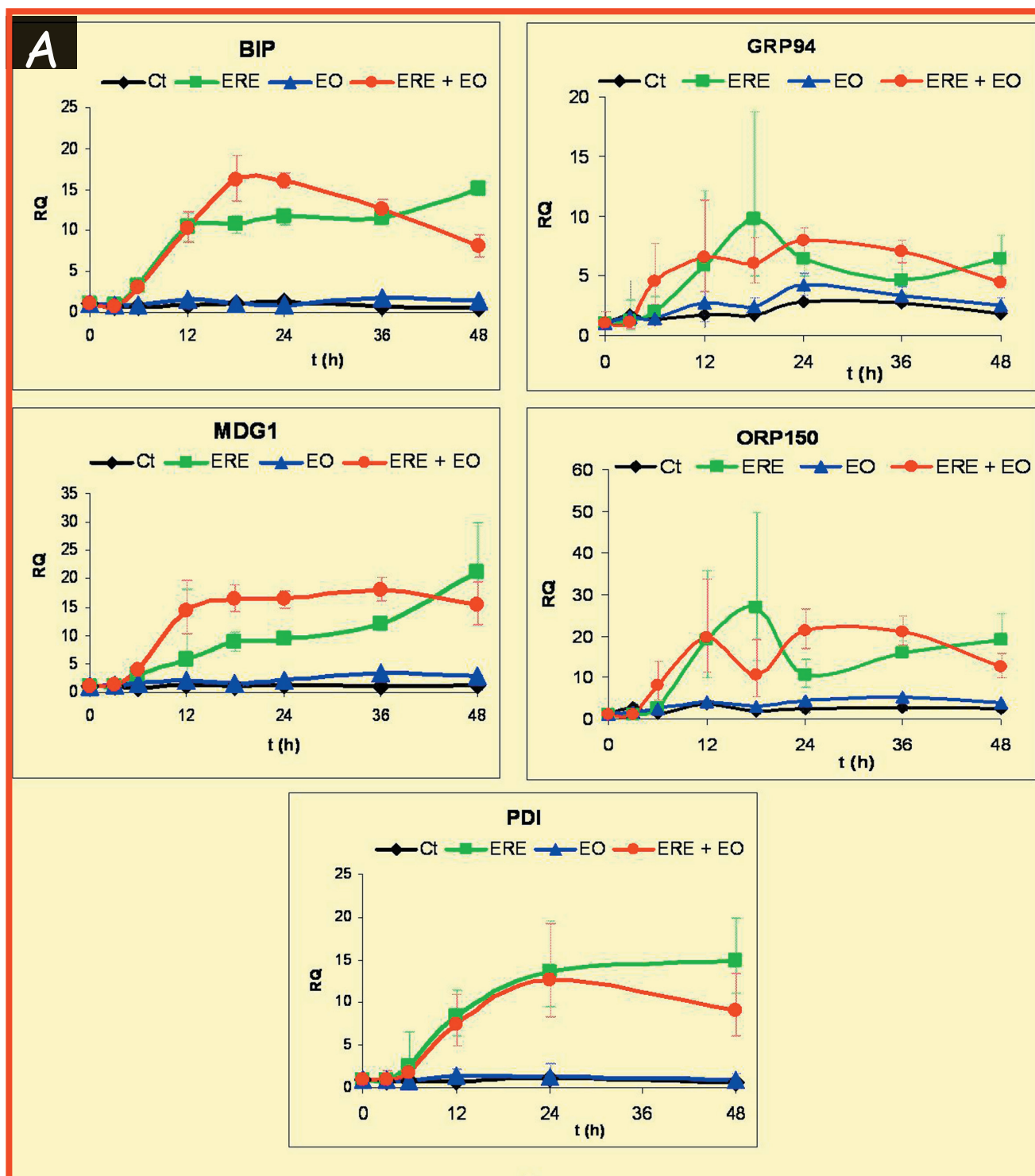


**Fig.R.20. Estudio cinético de la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC: los transductores del RE independientes de la fosforilación del factor eIF2α.** A) Esquema de los transductores del RE independientes de la fosforilación del factor eIF2α. B) Las células SKNMC fueron tratadas con Tm 2.5 µg/ml, X 10 µM / X-XOD 50 mU/ml y con ambos simultáneamente durante 0, 3, 6, 12, 18, 24, 36 y 48h, tras lo que se extrae el RNA y se realiza la RT-PCR en array, como se indica en el apartado 4.11 de Materiales y Métodos. En los distintos paneles se muestra en el eje de ordenadas las veces que cambia la expresión del gen tras los tratamientos respecto a las células control, y en el de abscisas los diferentes tiempos (h). Se indica el símbolo de cada gen cuya descripción se detalla en el texto.

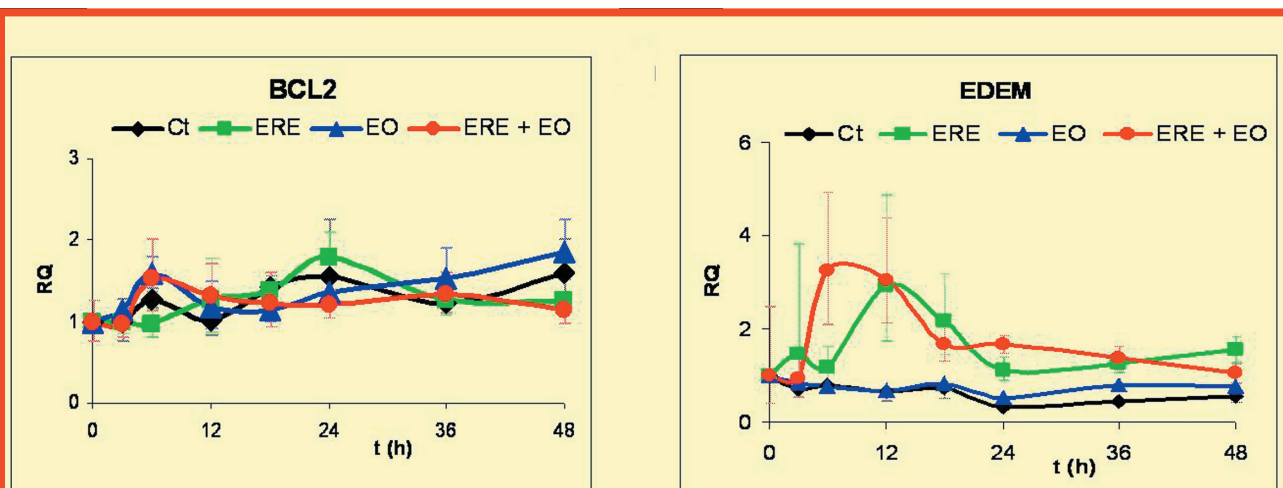
Otra proteína implicada también en este proceso es Bcl2, regulador clave en el control de la liberación de citocromo c y otros factores mitocondriales mediadores de apoptosis (Wang, 2001). Sin embargo, ninguno de los tratamientos de estrés indujo cambios en los niveles de expresión de Bcl2 (fig. R.21.B).

### III. Degradación asociada al RE.

La respuesta UPR, es capaz de inducir las proteínas relacionadas con la vía de degradación ERAD como la  $\alpha$ -manosidasa EDEM (Hosokawa y cols., 2001). En el análisis transcripcional de EDEM (fig. R.21.C), observamos que se encuentra sobreexpresado para los tratamientos de ERE y ERE+EO, no presentando cambios respecto al control en el tratamiento de EO.







**Fig.R.21. Estudio cinético de la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC: ruta de señalización de supervivencia vía UPR.** A) Activación transcripcional. B) Proteínas de supervivencia Bcl2. C) Degradación asociada al RE. Las células SKNMC fueron tratadas con Tm 2.5 µg/ml, X 10 µM / X-XOD 50 mU/ml y con ambos simultáneamente durante 0, 3, 6, 12, 18, 24, 36 y 48h, tras lo que se extrae el RNA y se realiza la RT-PCR en array, como se indica en el apartado 4.11 de Materiales y Métodos. En los distintos paneles se muestra en el eje de ordenadas las veces que cambia la expresión del gen tras los tratamientos respecto a las células control, y en el de abscisas los diferentes tiempos (h). Se indica el símbolo de cada gen cuya descripción se detalla en el texto.

Si analizamos los resultados de la activación de la vía de supervivencia en respuesta a los diferentes tipos de estrés, podríamos concluir que tanto en ERE como en ERE+EO se encuentran activadas todas las vías del RE que intentan solucionar el problema de acumulación de proteínas, además dicha activación está incrementada en ERE+EO al comparar con ERE. En el tratamiento con EO, sólo se encuentran activadas a las 36h GADD34, ATF6 e IRE1α; se podría decir que el EO activa la vía UPR a tiempos tardíos.

#### 4.2.2. Ruta de señalización a muerte.

Desde el RE pueden ser activadas conocidas rutas proapoptóticas, que también están mediadas por los transductores IRE1, ATF6 y PERK.

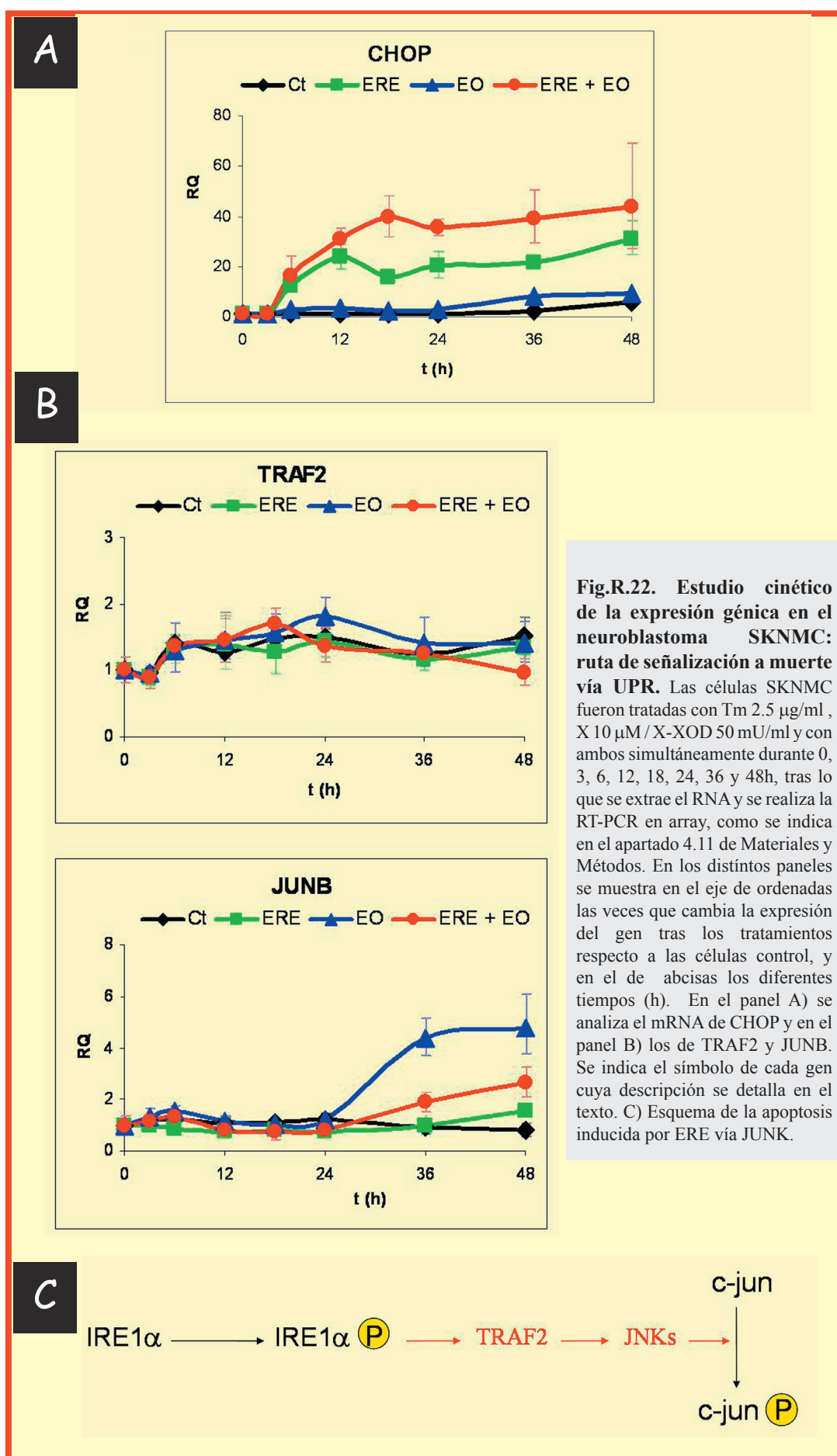
##### I. Apoptosis inducida por ERE: ruta de señalización de JNK.

Bajo ERE, el receptor IRE1 activado, puede reclutar adaptadores citosólicos como TRAF2, el cual se une a la quinasa señalizadora de apoptosis 1 (ASK1) y señala a través de la quinasa inhibidora de la c-jun N Terminal (JNK). Esta última provoca la fosforilación de c-jun, activando así la apoptosis dependiente de APAF1 en la mitocondria. Observamos las variaciones en el mRNA del punto intermedio, TRAF2, y del resultado de la vía, JUNB. Podemos ver (fig. R.22.B) que TRAF2 no presenta variaciones. Mientras que JUNB se sobreexpresa a partir de las 24h de tratamiento con EO, y también en la coexistencia de estreses se sobreexpresa pero en menor medida.

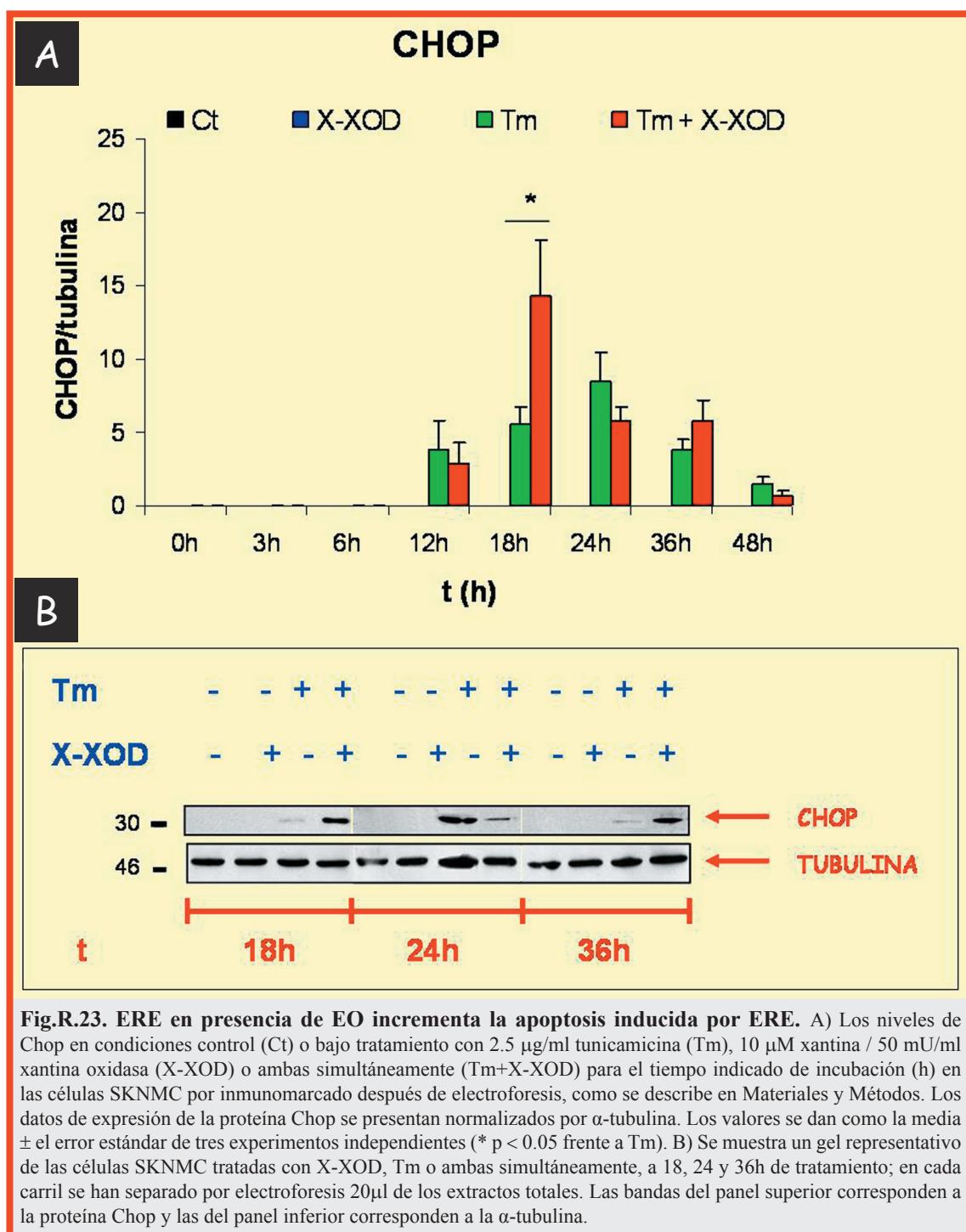
Lo que indicaban estos últimos resultados es que tanto en ERE como en ERE + EO, la vía de muerte más claramente activada parece ser la de CHOP.

##### II. Apoptosis inducida por ERE: CHOP

CHOP es la primera molécula implicada en la apoptosis inducida por ERE (Wang y cols., 1996). Como en el caso de las chaperonas del RE, la activación de IRE1, PERK o ATF6 lleva a la activación transcripcional de CHOP (Gotoh y cols., 2002; Harding y cols., 2000; Ron, 2002). Debido a la importancia de esta proteína en la apoptosis vía ER, analizamos su expresión no sólo a nivel transcripcional, sino también a nivel traduccional en los modelos celulares de estrés. Como podemos observar en la fig.R.22. A, el mRNA de CHOP se induce significativamente a partir de las 6h de tratamiento tanto en ERE como con la coexistencia de estreses (ERE+EO); además, en este último, la activación es dos veces mayor



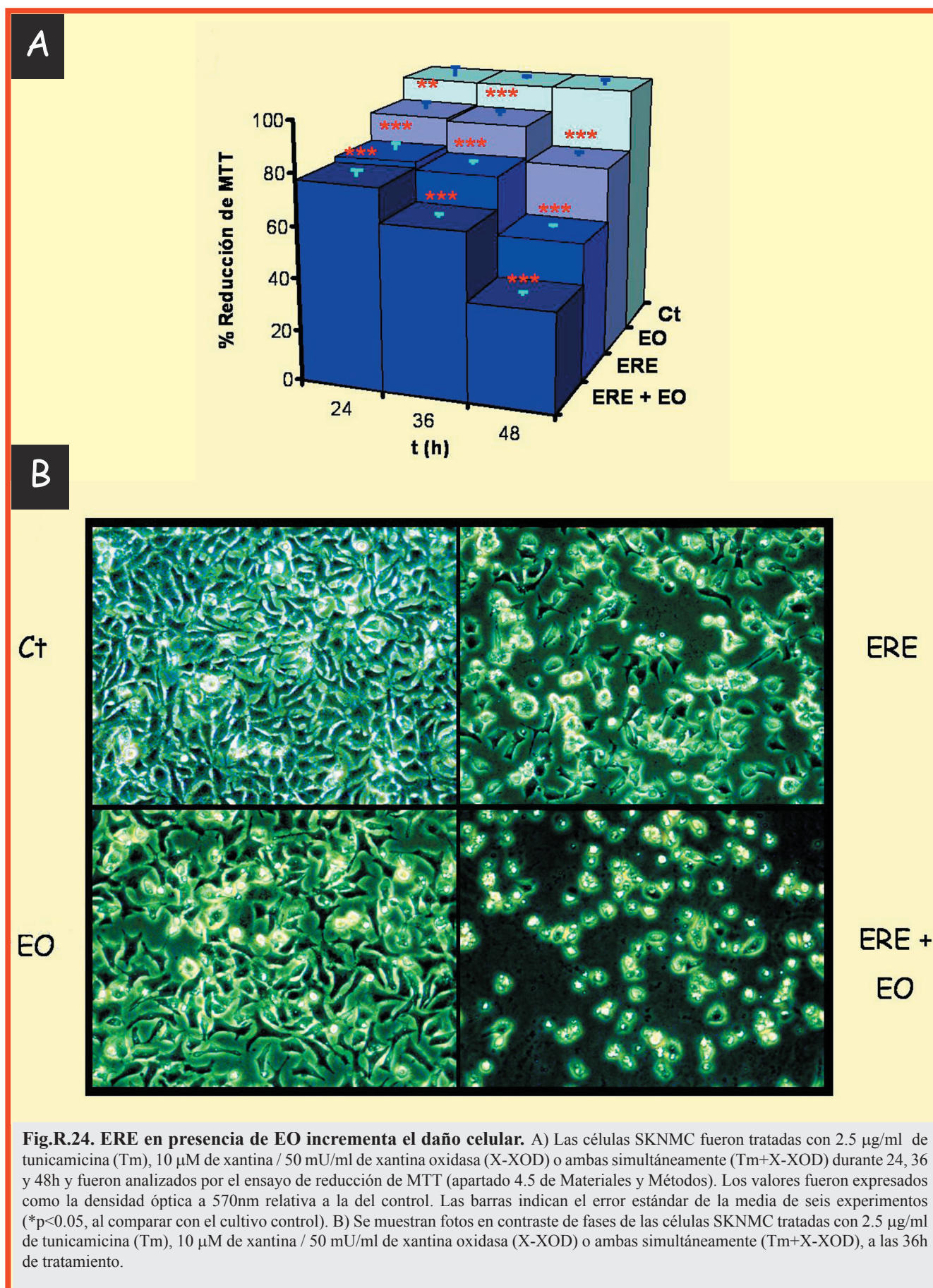
que con ERE. Los resultados del análisis de los niveles de la proteína con los mismos tratamientos (fig. R.23) revelaron que la combinación de ERE+EO activa más pronto la expresión de CHOP que ERE en el curso temporal analizado produciéndose un incremento significativo en su expresión a 18h del tratamiento, en referencia a ERE. La expresión de CHOP no era inducida por EO. Así pues, el ERE en presencia de EO aumenta la activación de la vía de muerte celular inducida por el ERE.



#### 4.3. APOPTOSIS EN EL MODELO CELULAR DE COEXISTENCIA DE ERE + EO.

Con los diferentes tratamientos de estrés empezamos a observar a partir de las 24h, sobre todo con ERE+EO, un aumento de la muerte celular que era más evidente a medida que aumentaba el tiempo de incubación. Para confirmar este proceso realizamos ensayos MTT de viabilidad celular a 24, 36 y 48h de tratamiento. En el ensayo de MTT, el ERE combinado con EO disminuía significativamente el porcentaje de reducción de MTT (con respecto a cada inductor de estrés sólo) a todos los tiempos de incubación, desde 24 a 48h (fig.R.24).





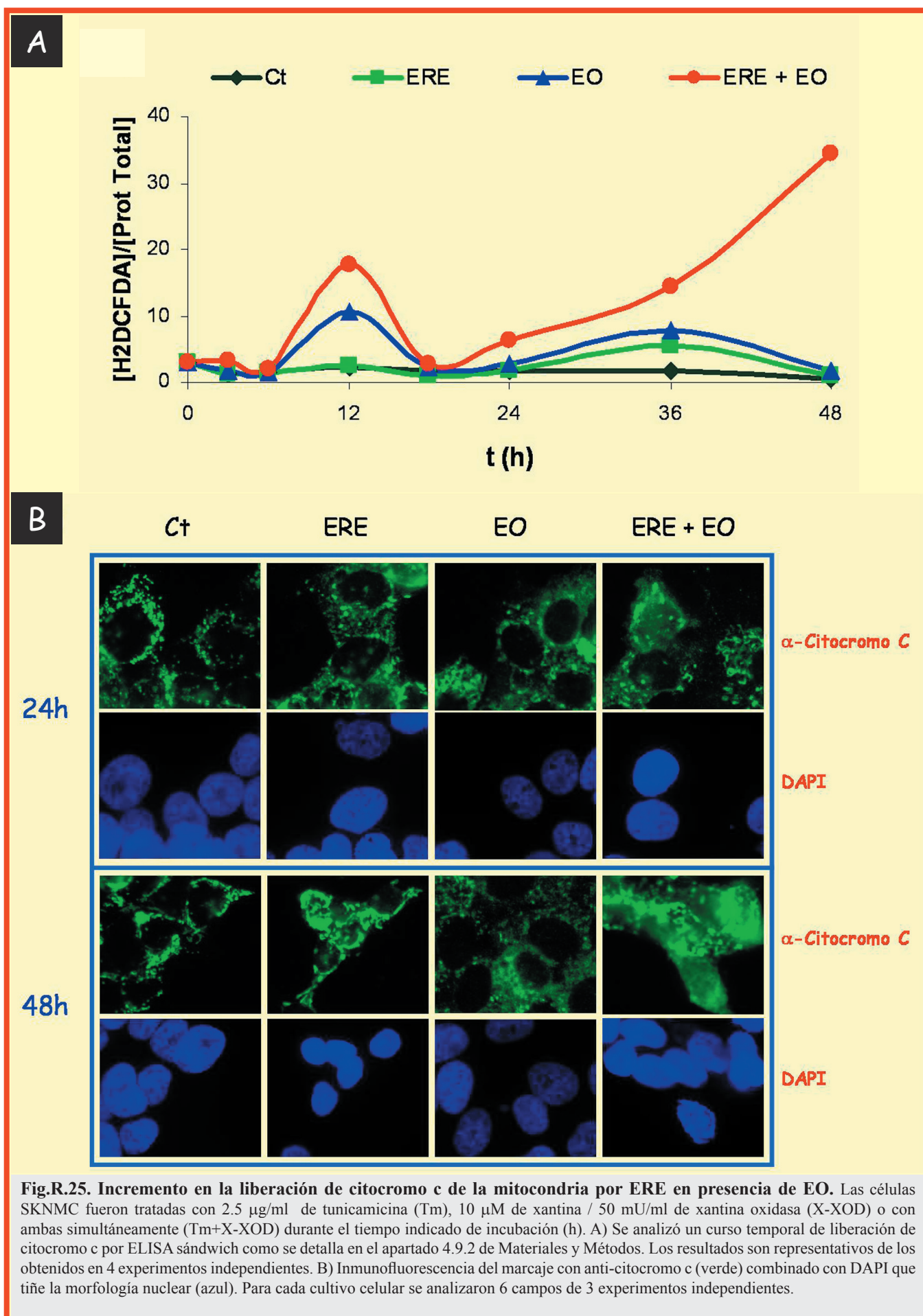
Además, el ERE combinado con el EO aumenta la regulación de la vía de muerte celular inducida por el ERE, tal y como se ha descrito en el apartado 5.3.2.I. Estos resultados indicaban un incremento en la activación de la muerte celular en la coexistencia de ERE y EO. Con el fin de profundizar en ello, realizamos ensayos con otros marcadores celulares asociados a procesos apoptóticos tales como disfunción mitocondrial y apoptosis dependiente de caspasas.

#### **4.3.1. Incremento de la disfunción mitocondrial por ERE en presencia de EO.**

La mitocondria juega un papel muy importante en la ruta intrínseca de apoptosis, y durante la disfunción mitocondrial. Algunos de los efectores apoptóticos esenciales, incluyendo procaspasas, citocromo C y factores de inducción de la apoptosis, son liberados al citosol (Marques y cols., 2003). Nosotros hemos caracterizado la disfunción mitocondrial en nuestros modelos celulares estudiando la liberación de citocromo C al citosol.

La cuantificación de la fracción citosólica utilizando un ensayo “ELISA sandwich” específico (fig.R.25.B), resultó una pronunciada liberación bifásica de citocromo C (Zhao y cols., 2005) después del tratamiento con ERE+EO, dicha liberación fué más alta que con EO sola. Sin embargo, no se detectó un aumento significativo de citocromo C en la fracción citosólica de las células tratadas con ERE.

Como muestran los experimentos de inmunofluorescencia específicos para citocromo C (fig. R.25.B) , se observaba una compartimentalización clara del citocromo C en la mitocondria (marcaje muy intenso y formando hebras) tanto en el cultivo control como en la células tratadas con ERE. Sin embargo, un incremento significativo de la liberación del citocromo C resultó a las 24 y 48h de tratamiento con ERE+EO, haciéndose patente por la pérdida del marcaje en forma de hebras a favor de un marcaje difuminado por todo el citosol. Este análisis de la distribución subcelular del citocromo C, confirmaba los resultados previos del “ELISA sándwich”.





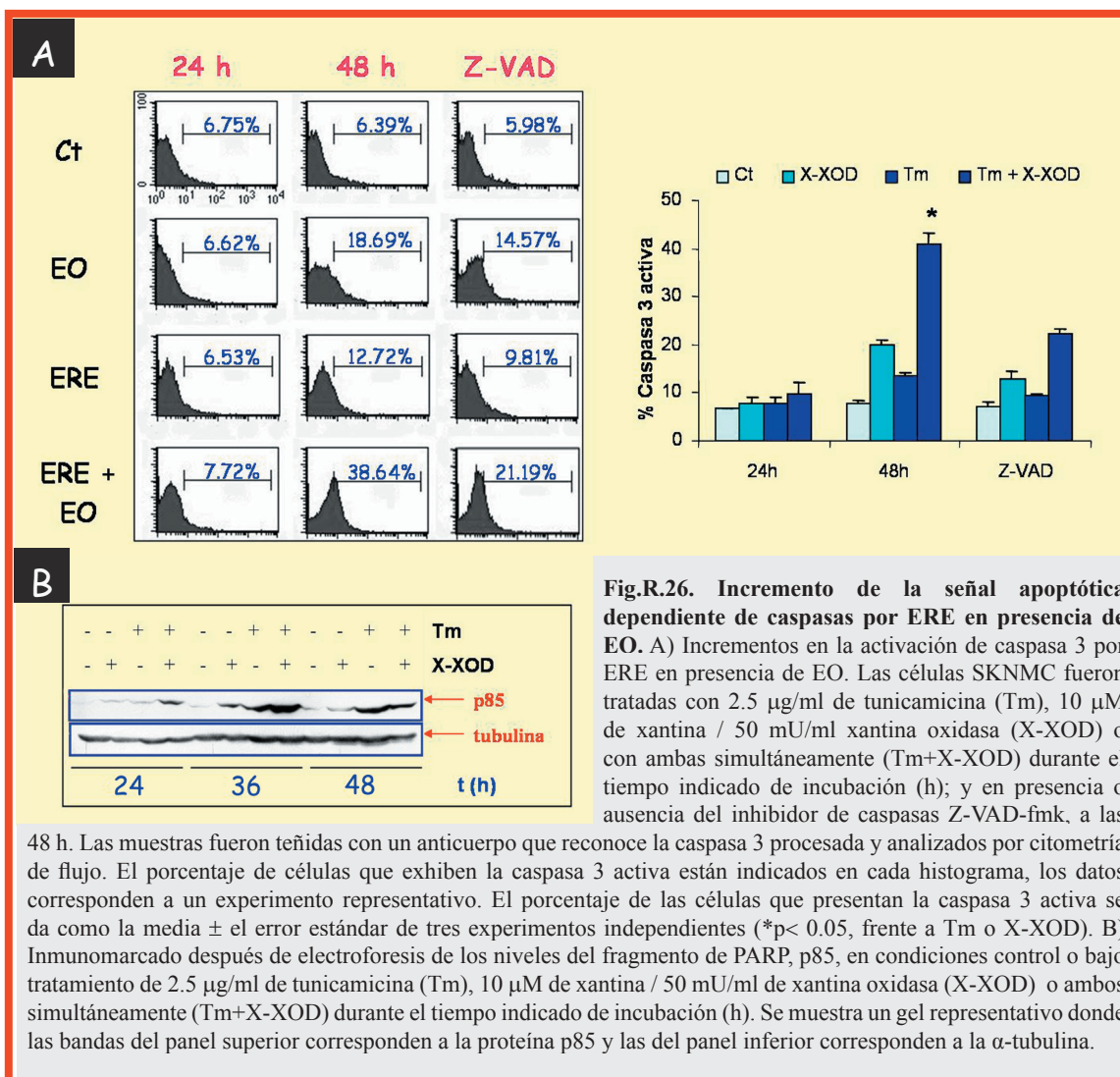
#### 4.3.2. Incremento en la señal apoptótica dependiente de caspasas por ERE en presencia de EO.

Además, estudiamos en nuestro modelo celular de ERE y EO la activación de caspasa 3 y de la degradación del sustrato de la caspasa, la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Analizamos por citometría de flujo la activación de caspasa 3 (utilizando el marcaje de caspasa 3 procesada). En este estudio se determinó el curso temporal de la activación de caspasa 3 por EO, ERE y ERE+EO (fig. R.26). La actividad de caspasa 3 estaba incrementada a las 48h del tratamiento con EO o con ERE (fig. R.26.A). Además, cuando los dos tratamientos se utilizaban de forma simultánea, la actividad de la caspasa 3 se incrementaba a las 24h de tratamiento, y de forma muy significativa a 48h. La activación de caspasa 3 disminuyó, en todos los casos, en presencia del inhibidor irreversible de amplio espectro de las caspasas, Z-VAD-fmk.

La activación de caspasa 3 se confirmó con el análisis de la degradación del sustrato de caspasas PARP (Hengartner, 2000). La proteína PARP-1, es una enzima que participa activamente en procesos de reparación del DNA y en transducción de señales, y su procesamiento se encuentra ligado a la activación de diversas cascadas de señalización apoptóticas (Soldani and Scovassi, 2002).

Para averiguar si nuestros tratamientos inducían el corte proteolítico de la proteína PARP-1, las células SKNMC fueron tratadas con ERE, EO y ERE+EO durante 24, 36 y 48h; posteriormente se analizó por inmunomarcado después de electroforesis la expresión del fragmento de p85, que resulta del corte proteolítico de la proteína intacta de 116 KDa por las caspasas, proteasas que intervienen en la ejecución del programa apoptótico (Alvarez-Gonzalez y cols., 1999).

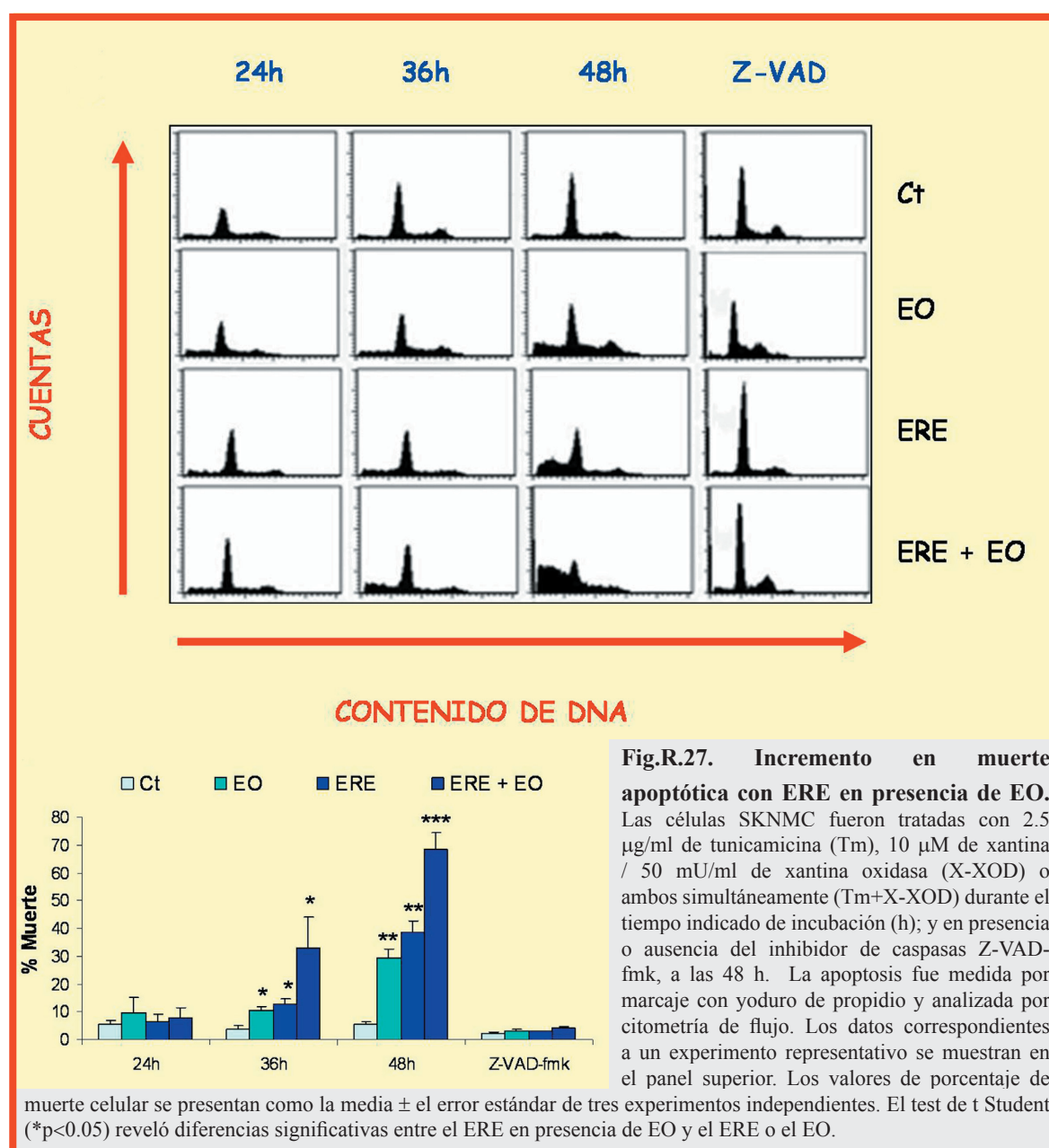
La fig.R.26.B muestra como los tratamientos de ERE y coexistencia de ERE+EO inducen, en mayor medida, la proteólisis de PARP-1 que EO solo. Además, el fragmento p85 aparece más tempranamente (a 24h) en el tratamiento con ERE+EO que en los tratamientos individuales.



Nuestros resultados indicaban que la EO y la ERE, de forma individual o simultánea, generan una señal apoptótica de una manera dependiente de caspasas; y que la combinación de estos dos inductores de estrés lleva al incremento de la muerte celular programada. Además, estos datos también sugieren que el ERE por Tm dirige una cascada específica que implica a la caspasa 3 por una vía independiente de citocromo C.

#### 4.3.3. Incremento de la apoptosis por ERE en presencia de EO.

Finalmente, cuantificamos la apoptosis por citometría de flujo después de la tinción con yoduro de propidio (fig.R.27). Cuando las células fueron expuestas a ERE en presencia de EO el porcentaje de células apoptóticas resultó fuertemente incrementado (36h:  $32,89 \pm 11,07\%$ , 48h:  $68,39 \pm 6,18\%$ ) al comparar con ERE (36h:  $12,71 \pm 2,07\%$ , 48h:  $38,49 \pm 4,21\%$ ) o EO (36h:  $10,65 \pm 1,26\%$ , 48h:  $29,59 \pm 3,05\%$ ). No se encontró señal de apoptosis a las 24h de tratamiento. Además, el inhibidor de caspasas, Z-VAD-fmk, disminuyó significativamente la muerte por apoptosis en todos los casos. La cuantificación de apoptosis reveló el aumento en la muerte celular de nuestro modelo de coexistencia de ERE y EO.





#### 4.4. ANÁLISIS DE EXPRESION GENICA DIFERENCIAL Y GENÓMICA FUNCIONAL DEL MODELO CELULAR DE NEURODEGENERACION.

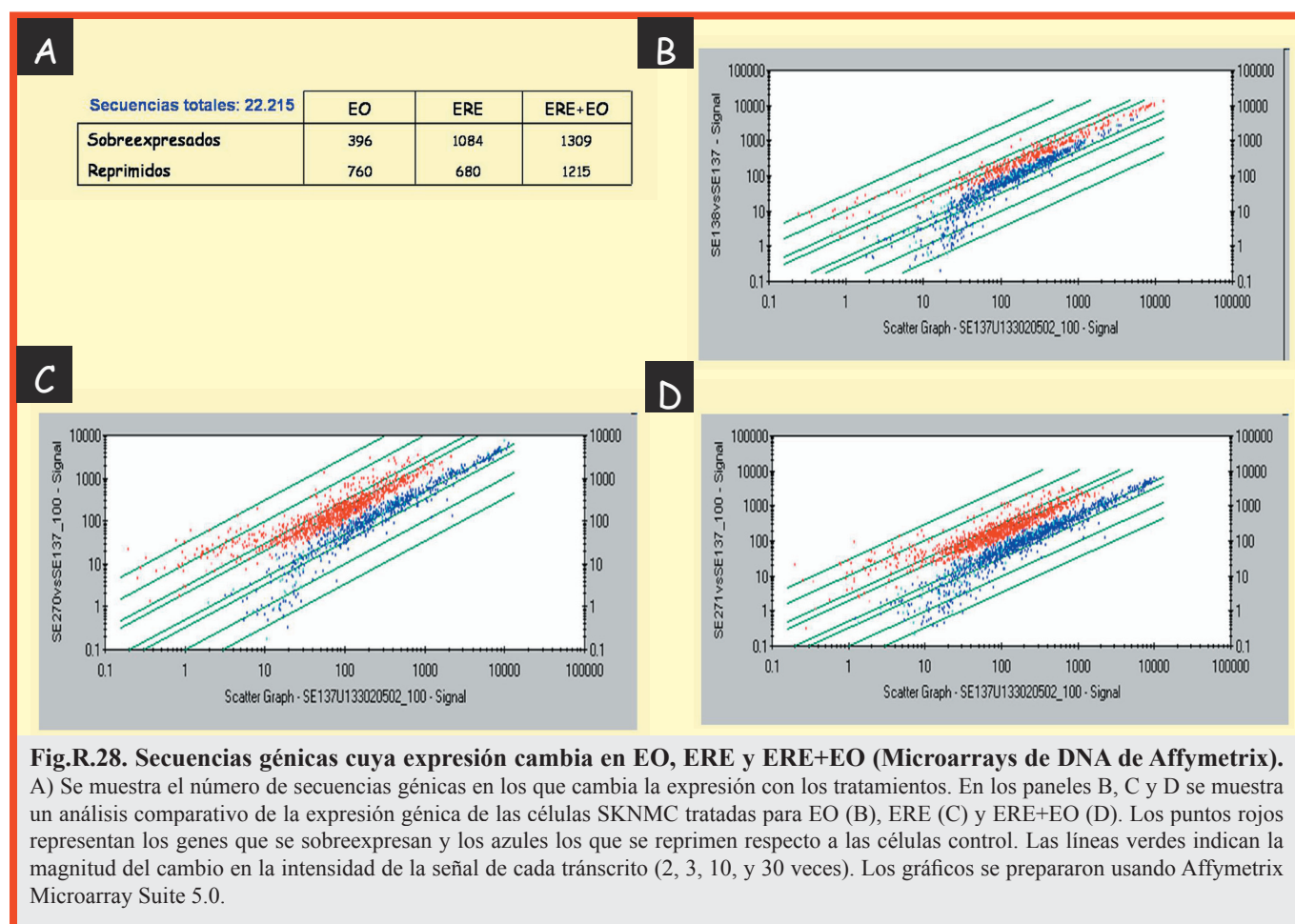
Realizamos, en el neuroblastoma SKNMC, análisis de expresión génica diferencial y estudios genómicos funcionales mediante Microarrays de DNA y RT-PCR en array con cada uno de los tratamientos, ERE, EO y ERE+EO.

##### 4.4.1. Estudio de la expresión génica diferencial.

Los tratamientos de estrés (ERE, EO o una combinación de ambos) producen una liberación de calcio, que actúa como segundo mensajero intracelular modificando numerosas funciones celulares; además, afectan a otras vías como son la UPR, liberación de citocromo C, diferentes rutas apoptóticas, etc... Para analizar las modificaciones en la expresión génica que tienen lugar por dichos tratamientos a un tiempo de incubación de 18h, llevamos a cabo un estudio por medio de la tecnología de Microarrays de DNA (Genechip, Affymetrix).

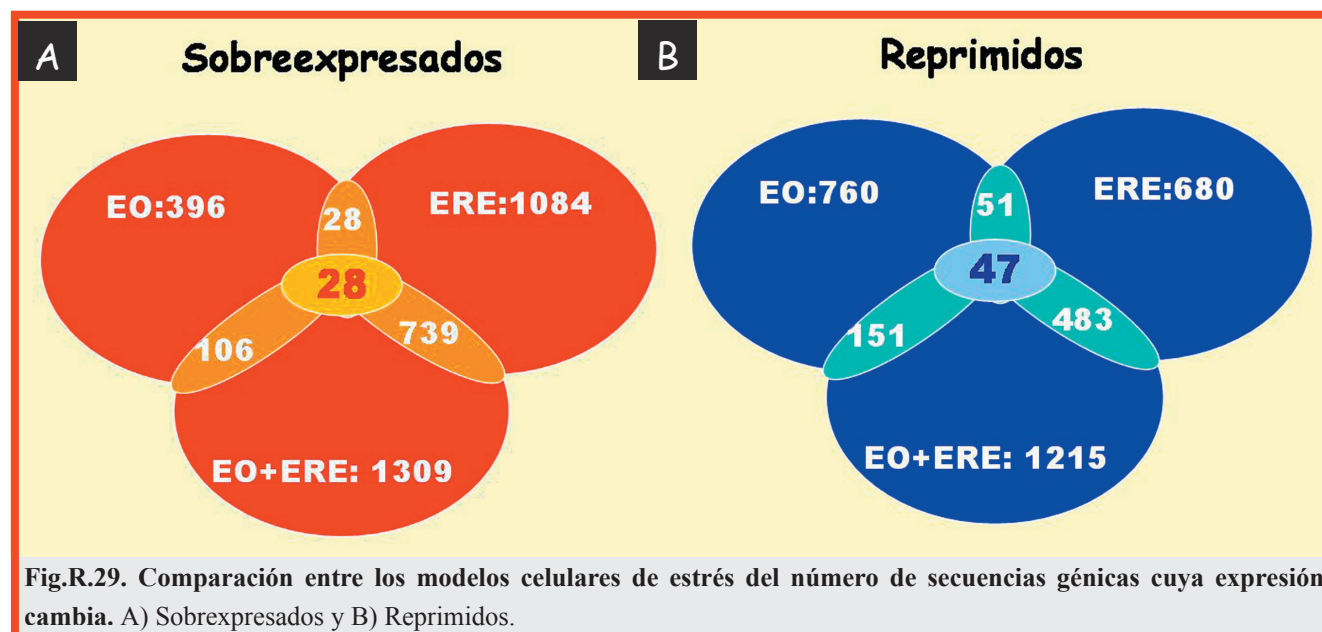
##### 4.4.1.1. Estudio de expresión génica mediante Microarrays de DNA (Affymetrix).

Del análisis de la expresión génica mediante Microarray de DNA de los modelos celulares de EO, ERE y ERE+EO, obtuvimos que, de las 22.215 sondas analizadas, aproximadamente 1.100 secuencias génicas para EO, 1.700 para ERE y 2.500 para ERE+EO (Fig. R.28), variaban su expresión más de 1,3 veces respecto a las células control.



A continuación identificamos los genes más sobreexpresados y más reprimidos después de cada tratamiento. Los resultados se muestran en las tablas R.1 a la R.6, en las que se indica el código GeneBank, el símbolo y el nombre del gen, así como los procesos biológicos en los que están implicados.

Para profundizar en la caracterización de las variaciones en la expresión génica del modelo de coexistencia de ERE y EO, llevamos a cabo el análisis de los genes, tanto sobreexpresados (fig.R.29.A) como reprimidos (fig.R.29.B), coincidentes entre los tratamientos. En las tablas de la R.7 a la R.10, se muestran los genes coincidentes entre ERE y EO; así como los genes coincidentes en los tres modelos celulares.



Tras un primer análisis de los resultados obtenidos en los cambios en la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC podemos deducir lo siguiente:

- Hay más genes que cambian su expresión en el modelo de ERE+EO, en relación a los modelos individuales, ERE y EO. Además, si nos fijamos en los dos modelos por separado, hay un mayor número de genes que varían su expresión en el caso de ERE que en EO.
- En el modelo de EO, hay un mayor número de genes reprimidos que sobreexpresados. De esta manera, al tiempo de tratamiento estudiado (18h), el EO parece relacionarse más con señales negativas, de represión, que con señales positivas, de sobreexpresión, en la línea celular SKNMC.
- Cuando comparamos los tres modelos, hay más genes coincidentes (47) entre los genes reprimidos que entre los genes sobreexpresados (28). Esto puede ser debido a que, como ya hemos dicho, el número de genes reprimidos en EO es casi el doble de los sobreexpresados.
- En genes sobreexpresados, los 28 genes coincidentes entre EO y ERE, y entre los tres modelos, son los mismos, aunque la magnitud del cambio es diferente (tablas R.7 y R.8).
- En genes reprimidos, la mayoría de los 47 genes coincidentes entre los tres modelos están en los 51 genes coincidentes entre ERE y EO (tablas R.9 y R.10).

#### 4.4.1.2. Validación mediante cuantificación de la expresión génica por RT-PCR en array.

Quisimos caracterizar en mayor profundidad los cambios de expresión génica en los modelos de EO y ERE a diferentes tiempos de incubación (horas) con los tratamientos de estrés. Se eligieron 93 genes de interés de acuerdo a dos criterios: por la magnitud del cambio de expresión obtenido en el Microarray de DNA o por su interés funcional. Posteriormente se estudió su perfil de expresión mediante RT-PCR en array.

De los 93 genes analizados por RT-PCR en array para el tratamiento con ERE, encontramos cambios en la expresión de 69; para el tratamiento con EO 63 genes presentaban cambios en su expresión. En la tabla R.11, se describen los genes analizados mediante RT-PCR en array en los que se observó

VRC	GeneBank	Símbolo	Nombre	Proceso biológico
42.2	gb:NM_018224.1		hypothetical protein FLJ10803	
34.3	gb:NM_012328.1	DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	
29.9	gb:NM_017697.1		hypothetical protein FLJ20171	
24.3	gb:NM_005681.1	TAF1A	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, A, 48kD	Promotor de la transcripción de la Pol I y de la Pol II
21.1	gb:NM_006260.1	DNAJC3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	Respuesta de defensa y regulación traduccional
19.7	gb:NM_022044.1	SDF2L1	stromal cell-derived factor 2-like 1	
16.0	gb:NM_003182.1	TAC1	tachykinin, precursor 1 (substance K, substance P, neurokinin 1, neurokinin 2, neuromedin L, neurokinin alpha, neuropeptide K, neuropeptide gamma)	Inseminación, señalización célula-célula y percepción de estímulos abióticos
14.9	gb:NM_018001.1		hypothetical protein FLJ10120	
13.0	gb:U31110.1			
13.0	gb:NM_005757.2		C3H-type zinc finger protein; similar to D. melanogaster muscleblind B protein	
12.1	gb:BC006344.1			
12.1	gb:NM_018168.1		hypothetical protein FLJ10650	
12.1	gb:U32581.2		PI-3-kinase-related kinase SMG-1	
11.3	gb:AL136712.1			
11.3	gb:NM_003122.1	SPINK1	serine protease inhibitor, Kazal type 1	
10.6	gb:AF052145.1	Hs00290118	Homo sapiens clone 24400	
10.6	gb:AB015706.1	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	Transducción de señales y respuesta inmune
10.6	gb:AF052059.1	SEL1L	sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	
9.9	gb:AK025862.1			
9.9	gb:NM_019891.1		endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-Lbeta	
9.2	gb:BG108193	NCBP1	nuclear cap binding protein subunit 1, 80kD	Procesamiento y exportación al núcleo del mRNA
8.6	gb:NM_024324.1		hypothetical protein MGC11256	
8.6	gb:NM_007107.1	SSR3	signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)	
8.6	gb:NM_006389.2	ORP150	oxygen regulated protein (150kD)	Respuesta a estrés
8.0	gb:NM_002317.1	LOX	lysyl oxidase	Modificación de proteínas
8.0	gb:NM_030820.1			
8.0	gb:AK023111.1			
7.5	gb:L16895			
7.0	gb:AI582238	TRA1	tumor rejection antigen (gp96) 1	Respuesta a estrés
7.0	gb:NM_005065.1	SEL1L	sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	

**Tabla R.1. Clasificación de los 30 genes más sobreexpresados en ERE.** Se indican las 30 secuencias génicas que más se sobreexpresan tras el tratamiento con 2.5 µg/ml de Tm durante 18h; en los genes conocidos se indica el símbolo, el nombre y la función biológica. Se ordenan de mayor a menor VRC (Veces Respecto al Control) y se indica el código de la secuencia en la base de datos GenBank.

VRC	GeneBank	Símbolo	Nombre	Proceso biológico
-22.6	gb:BE740743			
-12.1	gb:NM_006034.1		p53-induced protein	Respuesta a estrés. Control negativo de la proliferación celular
-12.1	gb:AF132204.1			
-11.3	gb:BF680255			
-8.6	gb:BC004857.1			
-7.5	gb:NM_024804.1		hypothetical protein FLJ12606	
-6.5	gb:BF541557			
-5.7	gb:NM_014254.1	TMEM5	transmembrane protein 5	
-5.3	gb:X89745.1			
-4.9	gb:NM_000618.1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Transducción de señales. Control positivo de la proliferación celular. Replicación del DNA. Desarrollo del músculo.Movilidad celular.
-4.9	gb:AW615612			
-4.9	gb:NM_000850.1	GSTM4	glutathione S-transferase M4	
-4.6	gb:N53536		ESTs, Weakly similar to dJ309K20.4 [H.sapiens]	
-4.3	gb:BE856776			
-4.3	gb:AW025261	RALBP1	ralA binding protein 1	Transducción de señales. Quimiotaxis
-4.3	gb:NM_005585.1	MADH6	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 6 (Drosophila)	
-3.7	gb:BC002654.1		tubulin beta-5	
-3.7	gb:AI189753			
-3.5	gb:AW303136			
-3.5	gb:NM_016307.2		paired related homeobox protein	
-3.5	gb:AV719355			
-3.3	gb:AK022922.1			
-3.3	gb:NM_018507.1		hypothetical protein PRO1843	
-3.3	gb:AV702405			
-3.3	gb:BE540552			
-3.3	gb:NM_016109.1	ANGPTL4	angiopoietin-like 4	
-3.03	gb:NM_018678.1		lipopolysaccharide specific response -68 protein	
-3.03	gb:BF246499		GW128 protein	
-3.03	gb:AA292281			
-3.03	gb:NM_000618.1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Transducción de señales. Control positivo de la proliferación celular. Replicación del DNA. Desarrollo del músculo.Movilidad celular.

**Tabla R.2. Clasificación de los 30 genes más reprimidos en ERE.** Se indican las 30 secuencias génicas que más se reprimen tras el tratamiento con 2.5 µg/ml de Tm durante 18h; en los genes conocidos se indica el símbolo, el nombre y la función biológica. Se ordenan de mayor a menor VRC (Veces Respecto al Control) y se indica el código de la secuencia en la base de datos *GenBank*.

VRC	GeneBank	Símbolo	Nombre	Proceso biológico
9.9	gb:AI765383			
8.0	gb:NM_015715.1	PLA2G3	group III secreted phospholipase A2	Metabolismo de fosfolípidos
7.0	gb:AL353759			
6.1	gb:NM_002865.1	RAB2	member RAS oncogene family	Trasporte del RE al Golgi
4.0	gb:BE300521	INSIG1	insulin induced gene 1	Metabolismo y proliferación celular
4.0	gb:BE300521	INSIG1	insulin induced gene 1	Metabolismo y proliferación celular
3.7	gb:NM_005542.1	INSIG1	insulin induced gene 1	Metabolismo y proliferación celular
3.5	gb:BC003164.1		leukocyte receptor cluster (LRC) member 4	
3.3	gb:NM_001286.1	CLCN6	chloride channel 6	Transporte de pequeñas moléculas
2.8	gb:U84246.1	NEU1	sialidase 1 (lysosomal sialidase)	
2.8	gb:NM_006579.1	EBP	emopamil binding protein (sterol isomerase)	Metabolismo del colesterol y desarrollo del esqueleto
2.8	gb:NM_000859.1	HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	Metabolismo y síntesis del colesterol y desarrollo de gónadas
2.8	gb:NM_005165.1	ALDOC	aldolase C, fructose-bisphosphate	Metabolismo de la fructosa
2.6	gb:AV704962	SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	Metabolismo de ácidos grasos y esteroides
2.6	gb:NM_000247.1	MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A	Reconocimiento celular, respuesta a estrés y respuesta inmune
2.6	gb:NM_004508.1	IDI1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	Biosíntesis de isoprenoides
2.6	gb:AL136658.1	C14orf1	chromosome 14 open reading frame 1	
2.6	gb:AW084510	LSS	lanosterol synthase (2,3-oxido-squalene-lanosterol cyclase)	Metabolismo de esteroides
2.6	gb:NM_000527.2	LDLR	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	Endocitosis, O-glicosilación y metabolismo de lípidos
2.6	gb:NM_001360.1	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	Metabolismo y biosíntesis del colesterol
2.5	gb:BG035985			
2.5	gb:NM_016569.1	TBX3	T-box 3 (ulnar mammary syndrome)	Promotor de la regulación de la transcripción de la Pol II, desarrollo del esqueleto, embriogénesis y morfogénesis
2.5	gb:NM_012347.1			
2.5	gb:NM_004794.1	RAB33A	member RAS oncogene family	
2.5	gb:NM_000247.1	MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A	Reconocimiento celular, respuesta a estrés y respuesta inmune
2.5	gb:NM_000431.1	MVK	mevalonate kinase (mevalonic aciduria)	Biosíntesis de isoprenoides y fosforilación de proteínas
2.5	gb:NM_014851.1		KIAA0469 gene product	
2.5	gb:AW150953	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	Metabolismo y biosíntesis del colesterol
2.5	gb:NM_005345.3	HSPA1A	heat shock 70kD protein 1A	Catabolismo del mRNA y respuesta heat shock
2.5	gb:NM_000391.2	CLN2	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2, late infantile (Jansky-Bielschowsky disease)	Metabolismo de lípidos, neurogénesis, proteólisis y peptidólisis

**Tabla R.3. Clasificación de los 30 genes más sobreexpresados en EO.** Se indican las 30 secuencias génicas que más se sobreexpresan tras el tratamiento con 10  $\mu$ M de xantina (X) / 50 mU/ml de XOD durante 18h; en los genes conocidos se indica el símbolo, el nombre y la función biológica. Se ordenan de mayor a menor VRC (Veces Respecto al Control) y se indica el código de la secuencia en la base de datos *GenBank*.



VCR	GeneBank	Símbolo	Nombre	Proceso biológico
-24.3	gb:NM_025226.1		MSTP032 protein	
-21.1	gb:NM_001432.1	EREG	epiregulin	Señalización célula-célula y ruta de señalización del receptor EGF
-19.7	gb:NM_019098.1	CNGB3	cyclic nucleotide gated channel beta 3	Transducción de señales y transporte de pequeñas moléculas
-19.7	gb:NM_004700.1	KCNQ4	potassium voltage-gated channel KQT-like subfamily, member 4	Transporte de potasio y audición
-18.4	gb:BF445199			
-16	gb:AF198444.1			
-14.9	gb:AL137010			
-13	gb:NM_030820.1			
-13	gb:NM_018665.1		DEAD-box protein	
-12.1	gb:AK022215.1			
-11.3	gb:NM_001982.1	ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	Fosforilación de proteínas
-9.9	gb:BC005856.1			
-9.2	gb:NM_020358.1	RNF18	ring finger protein 18	
-8	gb:N25621			
-7	gb:AB026816.1			
-7	gb:NM_014586.1	HUNK	hormonally upregulated Neu-associated kinase	Transducción de señales y procesos de desarrollo
-6.1	gb:NM_014932.1	NLGN1	neuroligin 1	
-5.7	gb:NM_003411.1	ZFY	zinc finger protein, Y-linked	Regulación de la transcripción
-4.9	gb:AL390170.1			
-4.9	gb:AB038463.1	CAPN9	calpain 9 (nCL-4)	Digestión
-4.6	gb:NM_005570.2	LMAN1	lectin, mannose-binding, 1	Coagulación sanguínea, plegamiento de proteínas y transporte del RE al Golgi
-4.6	gb:NM_002842.1	PTPRH	protein tyrosine phosphatase, receptor type, H	Defosforilación de proteínas
-4	gb:AW572909		KIAA0874 protein	
-4	gb:NM_024312.1		hypothetical protein MGC4170	
-4	gb:NM_007072.1	HHLA2	HERV-H LTR-associating 2	
-4	gb:NM_024111.1		hypothetical protein MGC4504	
-4	gb:AL031429	PTGER3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	Ruta de señalización de receptores ligados a proteínas G, transcripción dependiente de DNA y muerte celular
-3.7	gb:NM_000850.1	GSTM4	glutathione S-transferase M4	
-3.5	gb:AV721177			
-3.5	gb:NM_017661.1		hypothetical protein FLJ20086	

**Tabla R.4. Clasificación de los 30 genes más reprimidos en EO.** Se indican las 30 secuencias génicas que más se reprimen tras el tratamiento con 10  $\mu$ M de X / 50 mU/ml de XOD durante 18h; en los genes conocidos se indica el símbolo, el nombre y la función biológica. Se ordenan de mayor a menor VRC (Veces Respecto al Control) y se indica el código de la secuencia en la base de datos *GenBank*.

VRC	GeneBank	Símbolo	Nombre	Procesos biológicos
78.8	gb:NM_012328.1	DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	Respuesta a estrés
26	gb:AK023446.1			
26	gb:NM_002852.1	PTX3	pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	Respuesta inflamatoria
24.3	gb:NM_017697.1		hypothetical protein FLJ20171	
24.3	gb:NM_005681.1	TAF1A	TATA box binding protein (TBP) -associated factor, RNA polymerase I, A, 48kD	Promotor de la transcripción de la Pol I y de la Pol II
19.7	gb:NM_018001.1		hypothetical protein FLJ10120	
18.4	gb:NM_006260.1	DNAJC3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	Respuesta inmune. Regulación traduccional
16	gb:AF052145.1			
14.9	gb:NM_024862.1		hypothetical protein FLJ13962	
14.9	gb:NM_021805.1		single Ig IL-1R-related molecule	
13	gb:NM_002317.1	LOX	lysyl oxidase	Modificación de proteínas
13	gb:NM_022044.1	SDF2L1	stromal cell-derived factor 2-like 1	
13	gb:NM_018224.1		hypothetical protein FLJ10803	
13	gb:NM_005757.2		C3H-type zinc finger protein; similar to D. melanogaster muscleblind B protein	
12.1	gb:L16895			
12.1	gb:NM_030937.1			
12.1	gb:NM_001740.2	CALB2	calbindin 2, (29kD, calretinin)	
11.3	gb:BC006344.1			
9.9	gb:NM_030820.1			
9.9	gb:NM_019891.1		endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-Lbeta	
9.9	gb:AL353759			
9.9	gb:AF052059.1	SEL1L	sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	
9.2	gb:NM_006389.2	ORP150	oxygen regulated protein (150kD)	Respuesta a estrés
9.2	gb:AB033080.1			
8.6	gb:AL080081.1	DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	Respuesta a estrés
8	gb:NM_006624.1		adenovirus 5 E1A binding protein	Proliferación celular. Represión de la transcripción por el promotor de la Pol II
7.5	gb:AF217990.1	HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	
7.5	gb:AK025862.1			
7.5	gb:BC003637.1	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	Control del ciclo celular. Respuesta a daño en el DNA. Regulación de la transcripción
7	gb:AL137648.1		DKFZp434J1813 protein	

**Tabla R.5. Clasificación de los 30 genes más sobreexpresados en ERE+EO.** Se indican las 30 secuencias génicas que más se sobreexpresan tras el tratamiento simultáneo con 2.5 µg/ml de Tm y 10 µM de X / 50 mU/ml de XOD durante 18h; en los genes conocidos se indica el símbolo, el nombre y la función biológica. Se ordenan de mayor a menor VRC (Veces Respecto al Control) y se indica el código de la secuencia en la base de datos *GenBank*.

VRC	GeneBank	Símbolo	Nombre	Proceso biológico
-17.1	gb:U82303.1			
-17.1	gb:BC001766.1	S100B	S100 calcium binding protein, beta (neural)	Proliferación celular. Desarrollo del sistema nervioso. Axonogénesis
-16	gb:BE740743			
-14.9	gb:U73304	CNR1	cannabinoid receptor 1 (brain)	Comportamiento. Señalización de proteínas ligadas a nucleótidos cíclicos como segundos mensajeros
-13	gb:NM_007128.1	VPREB1	pre-B lymphocyte gene 1	
-13	gb:NM_000850.1	GSTM4	glutathione S-transferase M4	
-12.1	gb:BF680255			
-10.5	gb:NM_024780.1		hypothetical protein FLJ13593	
-10.6	gb:NM_013960.1	NRG1	neuregulin 1	
-10.6	gb:NM_006034.1	PIG11	p53-induced protein	Respuesta a estrés. Control negativo de la proliferación celular
-8.6	gb:D85245.1	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Transducción de señales
-8	gb:BC002666.1	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kD	
-8	gb:AJ000190			
-7.5	gb:BF541557			
-6.1	gb:NM_016109.1	ANGPTL4	angiopoietin-like 4	
-6.1	gb:AA243659		hypothetical protein DKFZp566A1524	
-6.1	gb:NM_000618.1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Transducción de señales. Control positivo de la proliferación celular. Replicación del DNA. Movilidad celular
-5.7	gb:NM_030786.1			
-5.3	gb:NM_014254.1	TMEM5	transmembrane protein 5	
-5.3	gb:NM_005627.1	SGK	serum/glucocorticoid regulated kinase	Fosforilación de proteínas. Respuesta a estrés. Transporte de sodio
-5.3	gb:NM_021138.1	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	Ensamblamiento del complejo proteico. Transducción de señales
-5.3	gb:AF153419.2	IKBKAP	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein	Fosforilación de proteínas. Respuesta inmune. Ensamblamiento del complejo proteico
-4.9	gb:NM_021995.1	UTS2	urotensin 2	Ruta de señalización de receptores ligados a proteínas G. Transmisión sináptica. Contracción del músculo. Regulación de la presión sanguínea
-4.9	gb:NM_003551.1	NME5	non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase)	Espermatogénesis. Metabolismo de nucleósidos
-4.9	gb:NM_005965.1			
-4.9	gb:AC002310	ITGAL	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)	Adhesión y movilidad celular
-4.6	gb:BC002654.1		tubulin beta-5	
-4.6	gb:NM_004700.1	KCNQ4	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 4	Transporte de potasio. Audición
-4.3	gb:NM_000618.1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Transducción de señales. Control positivo de la proliferación celular. Replicación del DNA. Movilidad celular
-4.3	gb:AI860431	PSMD1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1	

**Tabla R.6. Clasificación de los 30 genes más reprimidos en ERE+EO.** Se indican las 30 secuencias génicas que más se reprimen tras el tratamiento simultáneo con 2.5 µg/ml de Tm y 10 µM de X / 50 mU/ml de XOD durante 18h; en los genes conocidos se indica el símbolo, el nombre y la función biológica. Se ordenan de mayor a menor VRC (Veces Respecto al Control) y se indica el código de la secuencia en la base de datos *GenBank*.



	Gene-bank	Símbolo	Nombre
1	gb:NM_006389.2	ORP150	oxygen regulated protein (150kD)
2	gb:NM_024324.1		hypothetical protein MGC11256
3	gb:NM_000942.1	PPIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
4	gb:NM_000942.1	PPIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
5	gb:NM_003299.1	TRA1	tumor rejection antigen (gp96) 1
6	gb:L49506.1	CCNG2	cyclin G2
7	gb:NM_018630.1		hypothetical protein PRO2577
8	gb:NM_002970.1	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase
9	gb:AA085748		
10	gb:BC005807.1		
11	gb:AW134535	CCNG2	cyclin G2
12	gb:NM_015677.1		hypothetical protein
13	gb:NM_014745.1		KIAA0233 gene product
14	gb:NM_016128.1		coat protein gamma-cop
15	gb:BE910010		protein disulfide isomerase-related protein
16	gb:BE899402	TM9SF1	transmembrane 9 superfamily member 1
17	gb:BG260394	SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
18	gb:AI003763	FLJ12681	hypothetical protein FLJ12681
19	gb:AL523310		
20	gb:NM_024295.1		hypothetical protein MGC3067
21	gb:NM_014901.1		KIAA1100 protein
22	gb:AB028641.1	SOX11	SRY (sex determining region Y)-box 11
23	gb:AK026548.1		
24	gb:NM_014637.1		KIAA0009 gene product
25	gb:BC004155.1	RNF5	ring finger protein 5
26	gb:AK025298.1		autism-related protein 1
27	gb:Z54367		
28	gb:AA541630	RUNX3	runt-related transcription factor 3

**Tabla R.7. Genes sobreexpresados coincidentes en los tres modelos: ERE, EO y ERE+EO.** Se indican las 28 secuencias génicas que coincide que están sobreexpresadas en los tres modelos; en los genes conocidos se indica el símbolo y el nombre. Se indica el código de la secuencia en la base de datos *GenBank*.

	Gene-bank	Símbolo	Nombre
1	gb:NM_024324.1	MGC11256	hypothetical protein MGC11256
2	gb:NM_006389.2	ORP150	oxygen regulated protein (150kD)
3	gb:NM_000942.1	PPIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
4	gb:NM_000942.1	PPIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
5	gb:NM_003299.1	TRA1	tumor rejection antigen (gp96) 1
6	gb:NM_018630.1	PRO2577	hypothetical protein PRO2577
7	gb:NM_016128.1		coat protein gamma-cop
8	gb:BC005807.1		
9	gb:AA085748		
10	gb:BE910010		protein disulfide isomerase-related protein
11	gb:NM_002970.1	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase
12	gb:NM_014637.1		KIAA0009 gene product
13	gb:L49506.1	CCNG2	cyclin G2
14	gb:BG260394	SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
15	gb:NM_015677.1		hypothetical protein
16	gb:AL523310		
17	gb:AI003763	FLJ12681	hypothetical protein FLJ12681
18	gb:Z54367		
19	gb:AW134535	CCNG2	cyclin G2
20	gb:BE899402	TM9SF1	transmembrane 9 superfamily member 1
21	gb:AK026548.1		
22	gb:BC004155.1	RNF5	ring finger protein 5
23	gb:AA541630	RUNX3	runt-related transcription factor 3
24	gb:NM_014745.1	KIAA0233	KIAA0233 gene product
25	gb:NM_024295.1	MGC3067	hypothetical protein MGC3067
26	gb:AK025298.1		autism-related protein 1
27	gb:AB028641.1	SOX11	SRY (sex determining region Y)-box 11
28	gb:NM_014901.1	KIAA1100	KIAA1100 protein

**Tabla R.8. Genes sobreexpresados coincidentes en ERE y EO.** Se indican las 28 secuencias génicas que coincide que están sobreexpresadas en los modelos de ERE y EO; en los genes conocidos se indica el símbolo y el nombre. Se indica el código de la secuencia en la base de datos *GenBank*.

	Gene-bank	Símbolo	Nombre
1	gb:NM_000850.1	GSTM4	glutathione S-transferase M4
2	gb:NM_013960.1	NRG1	neuregulin 1
3	gb:NM_000618.1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
4	gb:AI860431	PSMD1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1
5	gb:BF446180		
6	gb:NM_014705.1	KIAA0716	KIAA0716 gene product
7	gb:BC000629.1	DARS	aspartyl-tRNA synthetase
8	gb:NM_005084.1	PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)
9	gb:NM_004237.1	TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13
10	gb:AI912583		
11	gb:NM_000104.2	CYP1B1	cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3, primary infantile)
12	gb:BF215487	PSMC2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2
13	gb:NM_005033.1	PMSCL1	polymyositis/scleroderma autoantigen 1 (75kD)
14	gb:NM_020474.2	GALNT1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase 1 (GalNAc-T1)
15	gb:NM_007072.1	HHLA2	HERV-H LTR-associating 2
16	gb:NM_006281.1	STK3	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)
17	gb:AV715767		
18	gb:AF053641.1	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
19	gb:NM_024571.1	FLJ22940	hypothetical protein FLJ22940
20	gb:AK021571.1		
21	gb:BC003572.1	KPNB1	karyopherin (importin) beta 1
22	gb:NM_001834.1	CLTB	clathrin, light polypeptide (Lcb)
23	gb:NM_000386.1	BLMH	bleomycin hydrolase
24	gb:NM_024111.1	MGC4504	hypothetical protein MGC4504
25	gb:BG034328	TFDP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)
26	gb:NM_014766.1	KIAA0913	KIAA0913 gene product
27	gb:AF053640.1	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
28	gb:NM_017958.1	FLJ20783	hypothetical protein FLJ20783
29	gb:NM_016299.1		likely ortholog of mouse heat shock protein, 70 kDa 4
30	gb:BF131791		WW domain-containing protein 1
31	gb:M37484.1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
32	gb:NM_016037.1	CGI-94	CGI-94 protein
33	gb:NM_004728.1		
34	gb:NM_019082.1		putative nucleolar RNA helicase
35	gb:AA806142		
36	gb:AF118652.1	TXNL2	thioredoxin-like 2
37	gb:BG491842	BOP1	block of proliferation 1
38	gb:NM_006392.1	NOL5A	nucleolar protein 5A (56kD with KKE/D repeat)
39	gb:NM_018492.1		PDZ-binding kinase; T-cell originated protein kinase
40	gb:NM_030978.1		
41	gb:NM_018128.1	FLJ10534	hypothetical protein FLJ10534
42	gb:NM_018460.1	BM046	uncharacterized bone marrow protein BM046
43	gb:NM_024805.1	FLJ21172	hypothetical protein FLJ21172
44	gb:NM_001237.1		
45	gb:NM_016310.1		
46	gb:AA648913	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
47	gb:M25077.1	SSA2	Sjogren syndrome antigen A2 (60kD, ribonucleoprotein autoantigen SS-A/Ro)

**Tabla R.9. Genes reprimidos coincidentes en los tres modelos: ERE, EO y ERE+EO.** Se indican las 47 secuencias génicas que coincide que están reprimidas en los tres modelos; en los genes conocidos se indica el símbolo y el nombre. Se indica el código de la secuencia en la base de datos *GenBank*.

	Gene-bank	Símbolo	Nombre
1	gb:NM_000618.1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
2	gb:NM_000850.1	GSTM4	glutathione S-transferase M4
3	gb:AI860431	PSMD1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1
4	gb:NM_013960.1	NRG1	neuregulin 1
5	gb:NM_001432.1	EREG	epiregulin
6	gb:NM_007072.1	HHLA2	HERV-H LTR-associating 2
7	gb:BF446180		
8	gb:NM_014705.1	KIAA0716	KIAA0716 gene product
9	gb:BC000629.1	DARS	aspartyl-tRNA synthetase
10	gb:NM_005084.1	PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)
11	gb:NM_000386.1	BLMH	bleomycin hydrolase
12	gb:BF215487	PSMC2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2
13	gb:AL043571		
14	gb:NM_004237.1	TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13
15	gb:AK021571.1		
16	gb:NM_024805.1	FLJ21172	hypothetical protein FLJ21172
17	gb:NM_024111.1	MGC4504	hypothetical protein MGC4504
18	gb:AI912583		
19	gb:M37484.1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
20	gb:BC003572.1	KPNB1	karyopherin (importin) beta 1
21	gb:NM_005033.1	PMSCL1	polymyositis/scleroderma autoantigen 1 (75kD)
22	gb:BG034328	TFDP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)
23	gb:NM_001237.1		
24	gb:NM_000104.2	CYP1B1	cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3, primary infantile)
25	gb:NM_020474.2	GALNT1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase 1 (GalNAc-T1)
26	gb:NM_014766.1	KIAA0193	KIAA0193 gene product
27	gb:NM_016037.1	CGI-94	CGI-94 protein
28	gb:NM_004728.1		
29	gb:NM_001834.1	CLTB	clathrin, light polypeptide (Lcb)
30	gb:NM_006281.1	STK3	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)
31	gb:NM_018492.1		PDZ-binding kinase; T-cell originated protein kinase
32	gb:NM_019082.1		putative nucleolar RNA helicase
33	gb:AA806142		
34	gb:AV715767		
35	gb:AF118652.1	TXNL2	thioredoxin-like 2
36	gb:AF053641.1	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
37	gb:NM_024571.1	FLJ22940	hypothetical protein FLJ22940
38	gb:AF053640.1	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
39	gb:NM_030978.1		
40	gb:NM_016310.1		
41	gb:NM_018128.1	FLJ10534	hypothetical protein FLJ10534
42	gb:AA648913	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
43	gb:NM_021929.1	FLJ21613	hypothetical protein FLJ21613 similar to rat corneal wound healing related protein
44	gb:NM_006806.1	BTG3	BTG family, member 3
45	gb:NM_017958.1	FLJ20783	hypothetical protein FLJ20783
46	gb:NM_016299.1		likely ortholog of mouse heat shock protein, 70 kDa 4
47	gb:NM_018460.1		uncharacterized bone marrow protein BM046
48	gb:BF131791		WW domain-containing protein 1
49	gb:BG491842	BOP1	block of proliferation 1
50	gb:NM_006392.1	NOL5A	nucleolar protein 5A (56kD with KKE/D repeat)
51	gb:M25077.1	SSA2	Sjogren syndrome antigen A2 (60kD, ribonucleoprotein autoantigen SS-A/Ro)

**Tabla R.10. Genes reprimidos coincidentes en ERE y EO.** Se indican las 51 secuencias génicas que coincide que están reprimidas en los modelos de ERE y EO; en los genes conocidos se indica el símbolo y el nombre. Se indica el código de la secuencia en la base de datos *GenBank*.

cambio, de al menos 1.3 veces, en su expresión para ERE o para EO.

En las tablas R.12 se indican las veces que cambia la expresión con el tratamiento de ERE y de EO durante 18 horas, respecto al control; también se detalla el intervalo de confianza al 95% (para las RT-PCRs) o el valor-p (para microarrays) entre paréntesis. Se señalan en rojo (sobrexpresión) o en azul (represión) los genes que no presentan el mismo resultado en la RT-PCR en array y en el Microarray de cDNA, y con un guión (-) aquellos en los que no se ha amplificado el fragmento génico. Los genes se denotan por su símbolo y su descripción se detalla en la tabla R.11, en la que se resumen sus características funcionales.

Un 85% de los genes que se sobreexpresaban según el Microarray de DNA se confirmaron por RT-PCR en array. En cuanto a los reprimidos, sólo en el 55% de los genes analizados concuerda el resultado por ambas técnicas; en el resto (45%) o no se observa variación tras el tratamiento, o se sobreexpresa, o no se amplifica el fragmento del gen por RT-PCR en array.

El estudio cinético del cambio en la expresión de los mRNAs después del tratamiento con ERE y con EO a los tiempos 12, 18 y 24 horas, se resume en las figuras R.30 y R.31. Este estudio muestra, en primer lugar, que la mayoría de los genes tienen un pico de inflexión de máxima o mínima expresión a las 18h de tratamiento; y en segundo lugar que los genes se pueden agrupar en “familias de expresión” como se detalla a continuación:

#### Genes sobreexpresados:

Hay genes en los que se detecta un aumento en la expresión a 12h y después la expresión disminuye, tanto con ERE (fig.R.30.B,D,F,G y J) como con EO (fig.R.31.F). Otros genes aumentan su expresión a las 12 horas y a partir de aquí la expresión disminuye hasta reprimirse, respecto al control, a las 24 horas (fig.R.30.M y R.31.I); y otros, se sobreexpresan a las 12 horas aumentando levemente a las 18 horas, tanto con ERE (fig.R.30.H) como con EO (fig.R.31.G), llegando a reprimirse entre 1.5 y 2 veces a las 24 horas después del tratamiento. Todos estos genes formarían un primer grupo de genes de expresión temprana.

Como ya vimos en el apartado 2.2 de Resultados a las 18h estaban activadas todas las vías de supervivencia y, a partir de las 24h, las vías de muerte celular. Por lo que podemos dividir los genes en un segundo grupo, los de la vía de supervivencia, es decir, que tienen un pico máximo de expresión a 18h; estos genes se encuentran tanto en ERE (fig.R.30.C, E y H) como en EO (fig.R.31.E y G). Y un tercer grupo, en el que se incluyen los genes cuya expresión coincide con el tiempo de iniciación de la muerte celular, 24h. En este grupo nos vamos a encontrar genes que se sobreexpresan a 12h, pero que su expresión sigue aumentando, llegando incluso a un incremento de 3 veces respecto al control en el modelo de ERE (fig.R.30.I).

Para ambos modelos, ERE y EO, coinciden los siguientes genes sobreexpresados: CAPN9, TRPC1, PLA2G3, TPD52, MYH13, COL6A3, EBP, GADD45A, NEB, DNAJC3 y BM039 (tabla R.11).

#### Genes reprimidos:

En el modelo de ERE (fig.R.30) obtenemos una represión máxima de 5.6 veces a tiempo temprano (12h); el gen de la aldolasa C (ALDOC) aparece reprimido a las 12h y continua reprimido hasta las 24h de tratamiento. En el caso del modelo de EO, nos encontramos que algún gen está totalmente reprimido (fig.R.31.I); el receptor de la 5-hidroxitriptamina (serotonina) 1F (HTR1F), que parte de una expresión de 1.3 a las 12h, se reprime totalmente a las 18h y permanece con una expresión baja (una represión de hasta 6 veces) a las 24h de tratamiento.

Para ambos modelos, ERE y EO, coinciden los siguientes genes reprimidos: PTPN22, NLGN1, SMARCA1, MMP2, DIAPH1 y LGALS1 (tabla R.11).

Descripción	Gen	Proceso biológico
1	-Hs00290118_s1	
2	ABCD2	Transporte de pequeñas moléculas. Metabolismo de ács. Grasos
3	ADCY7	Transducción de señales
4	ALDOC	Metabolismo de la fructosa
5	APOE	Metabolismo del colesterol. Respuesta inmune
6	ASK	Regulación del ciclo celular
7	ATR	Progresión del ciclo celular
8	BACE2	Modificación y secreción de proteínas
9	BM039	-
10	CAPN9	Digestión
11	CDH2	-
12	CDK2	Control del ciclo celular
13	CLCN6	Transporte de pequeñas moléculas
14	CMG1	Morfogénesis capilar
15	CNNM1	-
16	COL6A3	Desarrollo del músculo
17	CREB1	Favorece la transcripción de los genes con elementos de respuesta a cAMP
18	CREB3	Favorece la transcripción de los genes con elementos de respuesta a cAMP
19	CREM	Represión de la transcripción inducida por cAMP
20	CRYAB	Visión. Contracción muscular
21	CUL5	Transducción de señales intracelulares
22	CYP2C9	-
23	DIAPH1	Mantenimiento del citoesqueleto de actina en células del oído
24	DNAJB9	Respuesta a malplegamiento de proteínas
25	DNAJC3	Respuesta de defensa y regulación de la traducción
26	DSC1	Control de la forma y tamaño celulares
27	EBP	Metabolismo del colesterol. Desarrollo del esqueleto
28	EREG	Señalización célula-célula. Ruta de señalización del receptor EGF
29	-	-
30	-	-
31	-	-
32	-	-
33	-	-
34	FSBP	-
35	GADD45A	Control del ciclo celular
36	GDAPI	Transducción de señales en el desarrollo neuronal
37	GNG12	Transducción de señales
38	GNPMB	Control negativo de la proliferación celular. Oncogénesis
39	HMGCR	Biosíntesis de colesterol
40	HSPA5	Plegamiento de proteínas. Respuesta a estrés
41	HTATSF1	Elongación y procesamiento alternativo en la transcripción
42	HTR1F	Transmisión sináptica
43	HUNK	Transducción de señales. Procesos de desarrollo

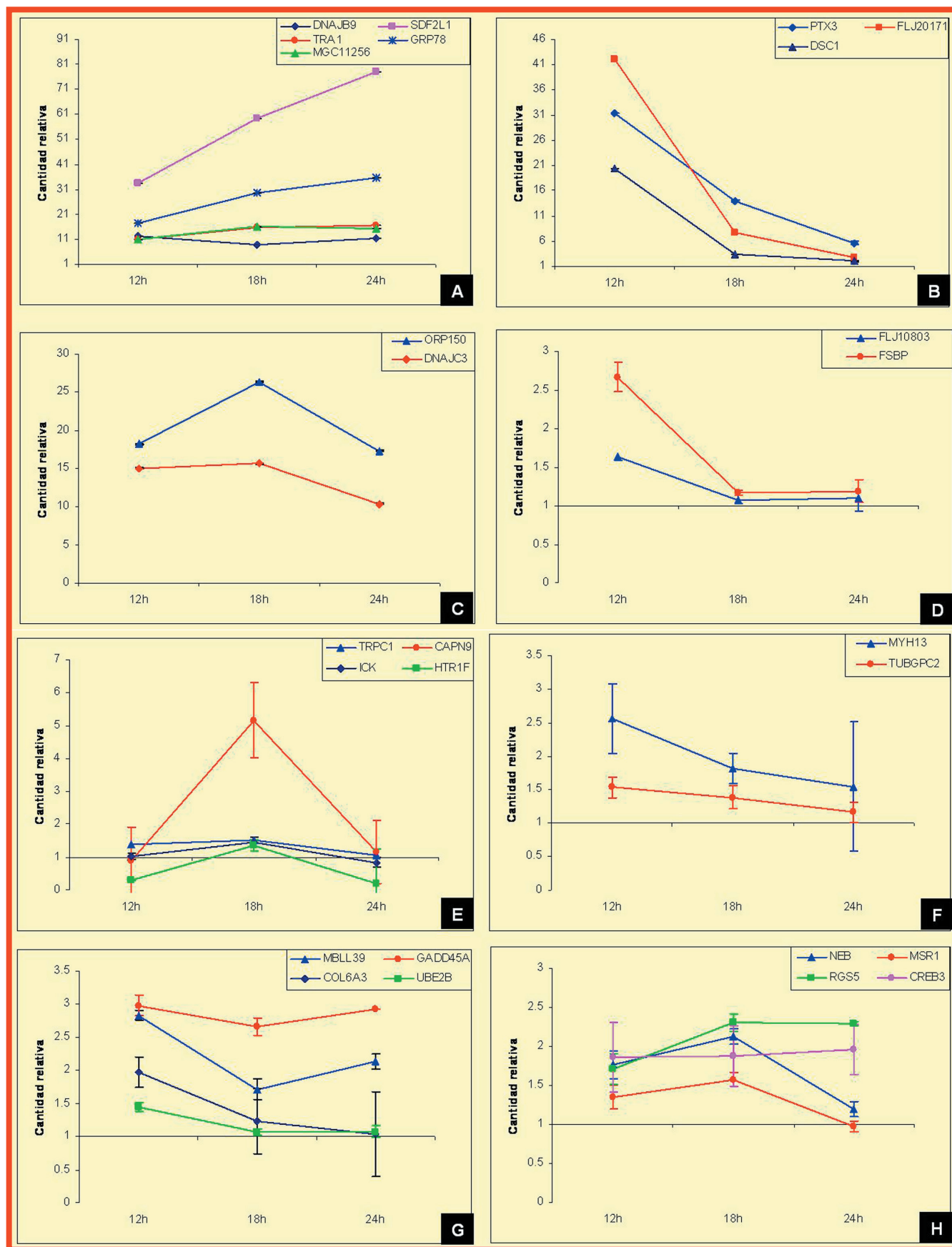


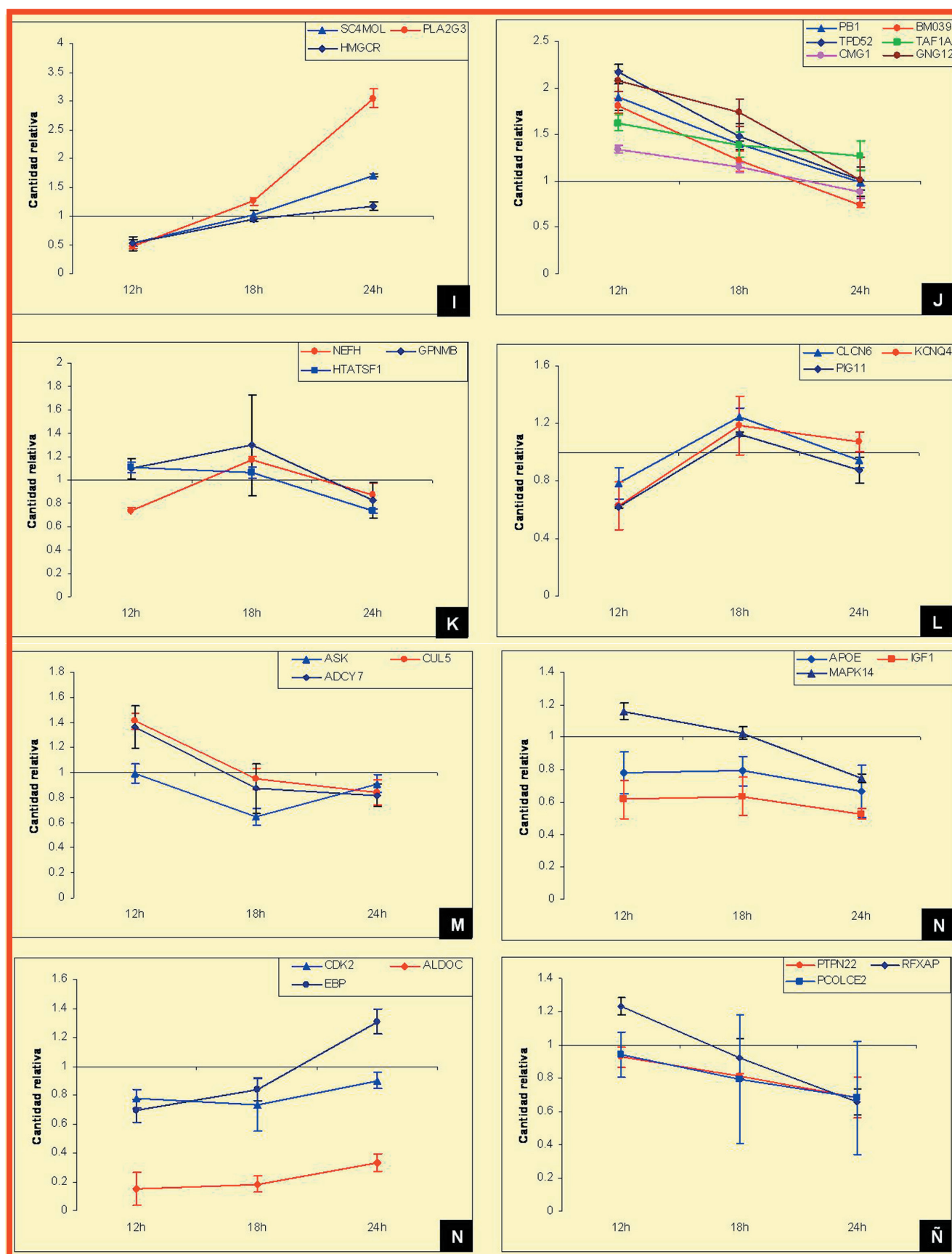
44	oxygen regulated protein (150kD)	HYOU1	Respuesta a estrés
45	MAK-related kinase	ICK	Transducción de señales
46	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1	Transducción de señales. Control positivo de la proliferación celular
47	insulin-like growth factor binding protein 7	IGFBP7	Control negativo de la proliferación celular
48	insulin induced gene 1	INSIG1	Proliferación celular. Metabolismo
49	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 4	KCNQ4	Transporte de potasio
50	malignant cell expression-enhanced geneturor progression-enhanced gene	LENG4	-
51	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	LGALS1	Mantenimiento del ciclo en G1 y paso a G2. Apoptosis
52	mitogen activated protein kinase 14	MAPK14	Quinasa activada por estrés Quinasa
53	-	MBLL39	-
54	hypothetical protein MGC11256	MGC11256	-
55	matrix metalloproteinase 2	MMP2	Proteolisis
56	macrophage scavenger receptor 1	MSR1	Internalización de moléculas cargadas negativamente
57	myosin, heavy polypeptide 13,skeletal muscle	MYH13	Movimiento del ojo
58	nebulin	NEB	Desarrollo del músculo
59	neurofilament, heavy (200kD)	NEFH	-
60	sialidase 1 (lysosomal sialidase)	NEU1	-
61	neuroligin 1	NLGN1	Implicada en la formación de novo de estructuras presinápticas
62	polybromo 1	PBI	Transactivación de receptores hormonales nucleares
63	collagen C-endopeptidase enhancer 2	PCOLCE2	Biosíntesis de colágeno
64	p53-induced protein (PIG11)	PIG11	Respuesta a estrés. Control negativo de la proliferación celular
65	group III secreted phospholipase A2	PLA2G3	Metabolismo de fosfolípidos
66	protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 22 (lymphoid)	PTPN22	Supresor de la activación de células T
67	pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	PTX3	Respuesta inflamatoria
68	retinoblastoma binding protein 1	RBBP1	Transcripción del promotor de Pol II
69	regulatory factor X-associated protein	RFXAP	Transcripción del promotor de Pol II
70	regulator of G-protein signalling 5	RGS5	Ruta de señalización de receptores ligados a la regulación de proteínas G
71	ring finger protein 18	RNF18	Implicada en regulación de la transcripción, carcinogénesis y transformación celular
72	sterol-C4-methyl oxidase-like	SC4MOL	Metabolismo de ács. Grasos. Metabolismo de esteroides
73	stearoyl-CoA desaturase (delta 9 desaturase)	SCD	Oxidoreductasa
74	syndecan 1	SDC1	Receptor de la matriz extracelular
75	stromal cell-derived factor 2-like 1	SDF2L1	Respuesta a mal plegamiento de proteínas
76	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	SMARCA1	Modelación de la cromatina Adenosina trifosfatasa. Helicasa
77	tachykinin, precursor 1 (substance K, substance P, neurokinin K, neuropeptide gamma)	TAC1	Inseminación. Señalización célula-célula
78	TATA-box binding protein (TBP)-associated factor, RNA Pol I, A, 48kDa	TAF1A	Factor de transcripción para RNA Pol I, II y III Proteína de unión a la caja TATA
79	tumor protein D52	TPD52	Señales mediadas por calcio. Oncogénesis
80	tumor rejection antigen (gp96)	TRA1	Respuesta a mal plegamiento de proteínas. ERE
81	transient receptor potential channel 1	TRPC1	Transportador de ión calcio Canal de calcio

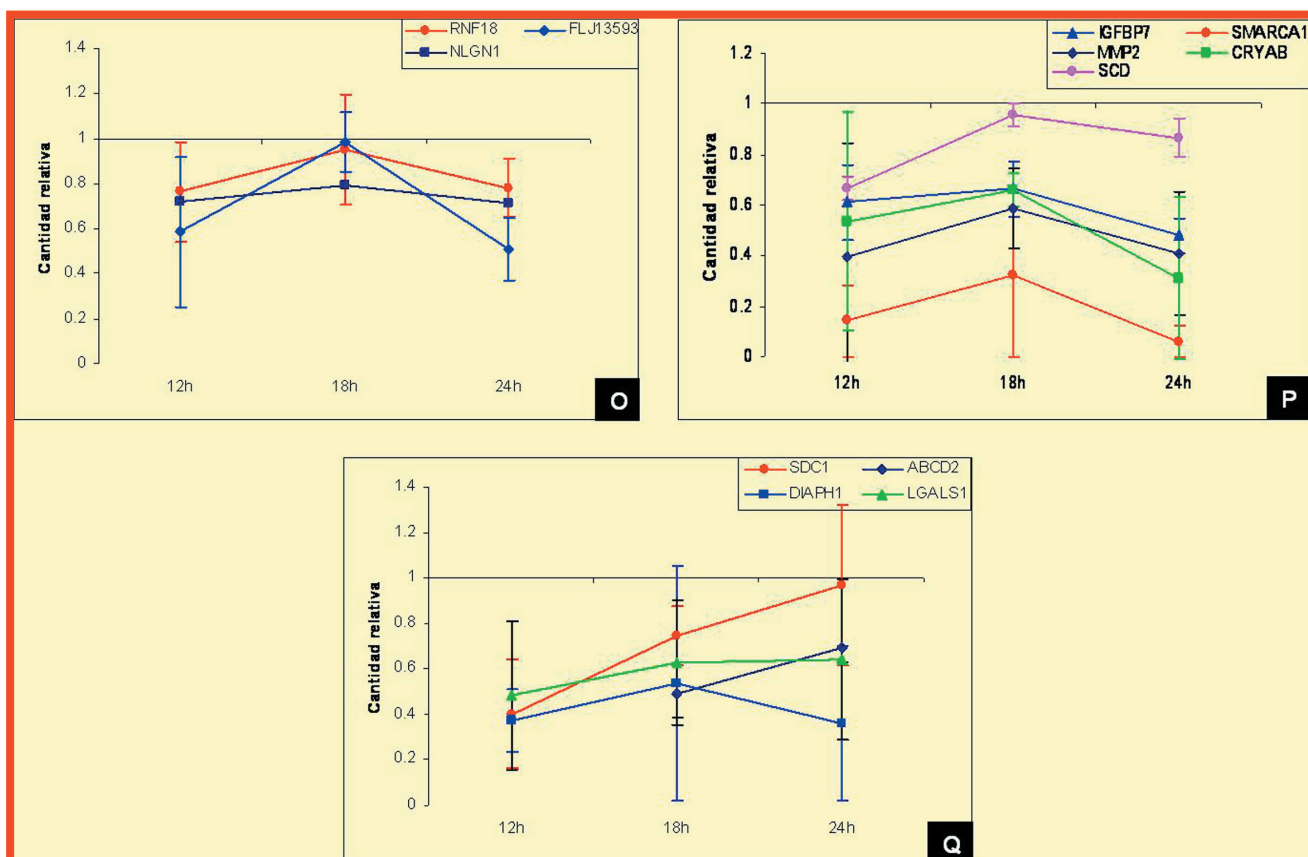
**Tabla R.11. Descripción de los genes que alteran su expresión génica, por RT-PCR en array, en ERE y EO.**

Se indica el símbolo y el nombre de cada gen, que usaremos en las tablas y figuras siguientes y el papel biológico y la función celular cuando son conocidas.



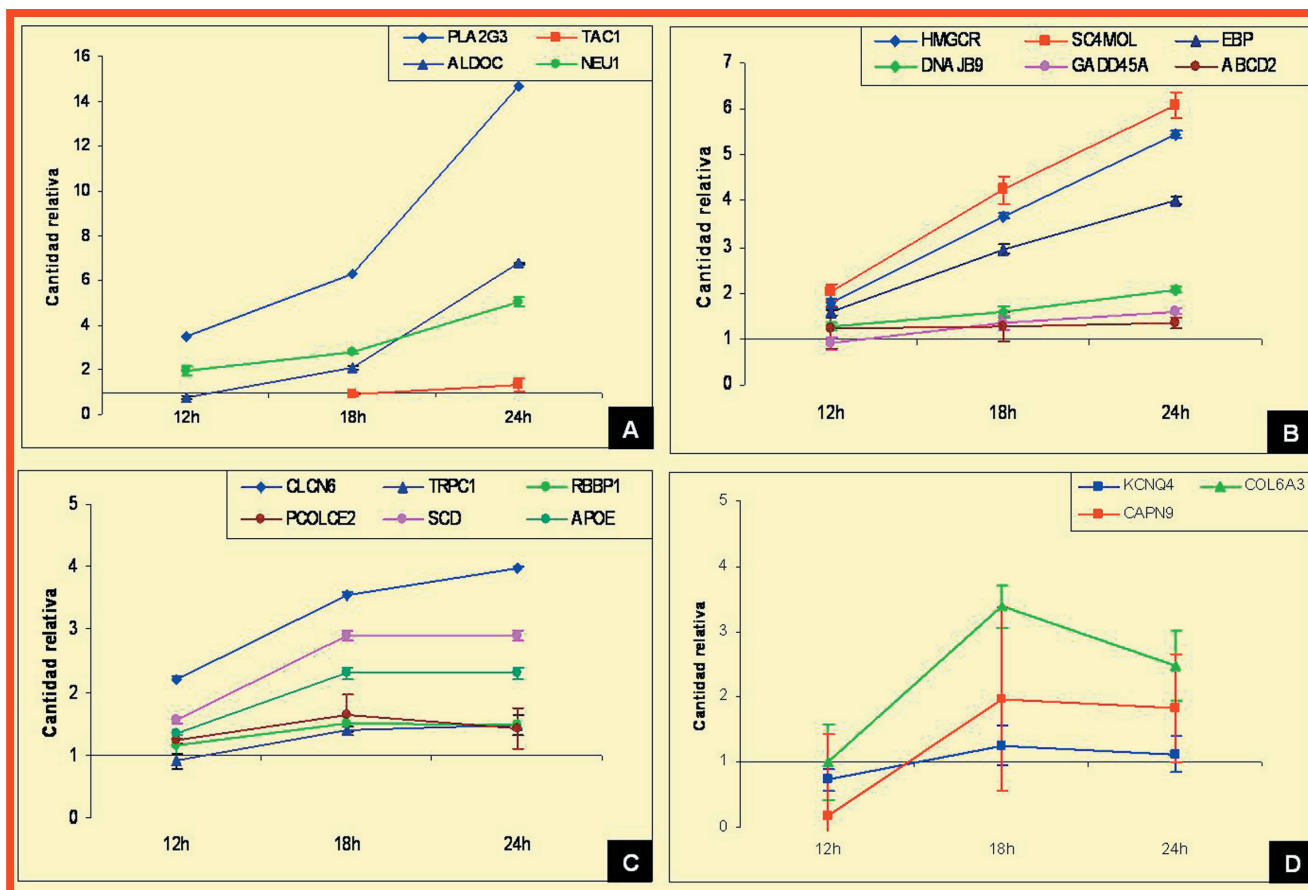


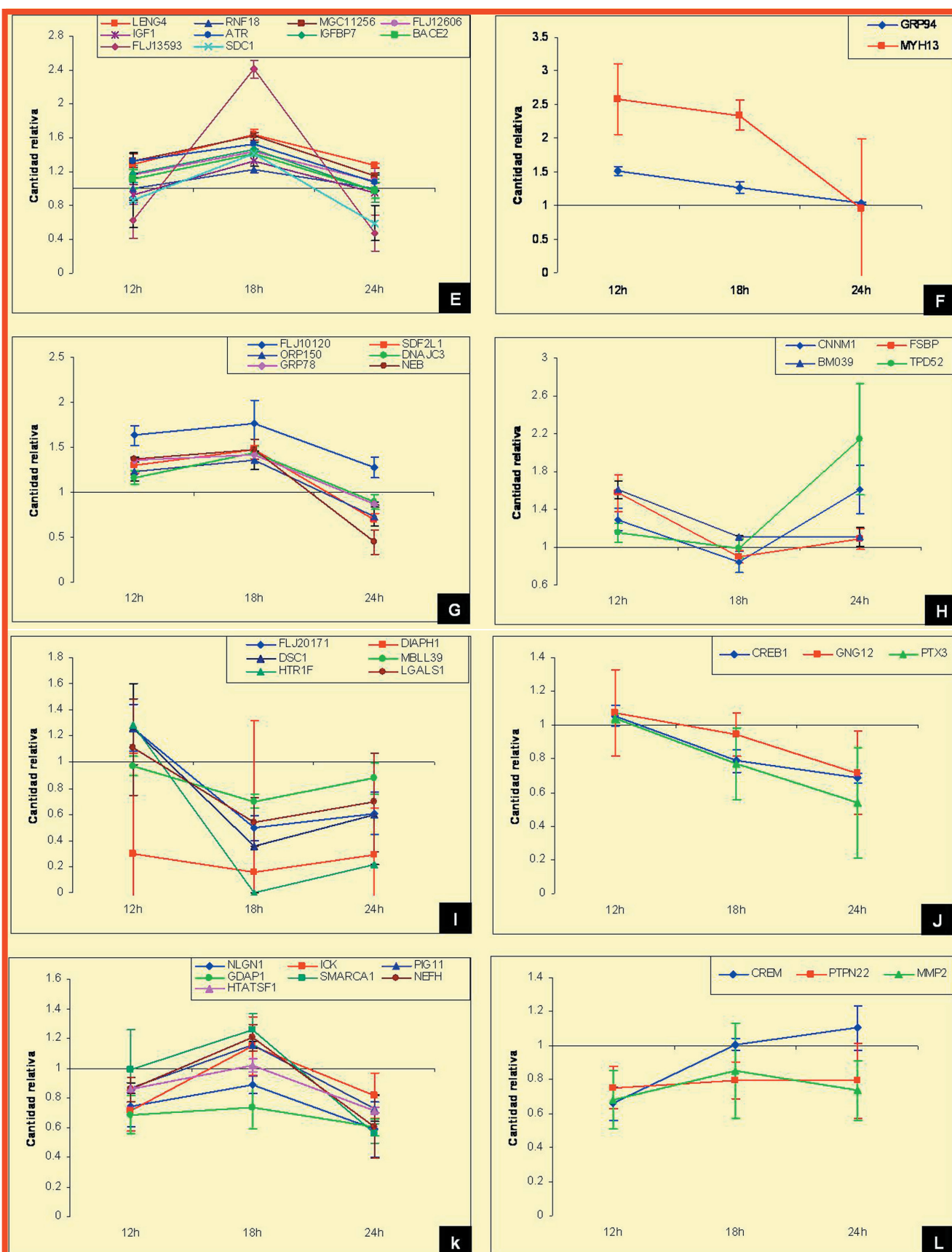




**Fig.R. 30. Estudio cinético de la expresión génica en neuroblastoma humano SKNMC tras el tratamiento con Tm.**

La línea celular SKNMC es cultivada en presencia o ausencia de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de Tm durante 12, 18 y 24 horas, tras lo que se extrae el RNA y se realiza la RT-PCR en array, como se indica en Materiales y Métodos. En los distintos paneles de la figura se muestra en el eje de las ordenadas las veces que cambia la expresión del gen tras el tratamiento respecto a las células sin tratar y en el de las abscisas los diferentes tiempos, 12, 18 y 24 horas. Se indica el símbolo de cada gen cuya descripción se detalla en la tabla R.11.





**Fig.R.31. Estudio cinético de la expresión génica en neuroblastoma humano SKNMC tras el tratamiento con XOD.** La línea celular SKNMC es cultivada en presencia o ausencia de 10  $\mu$ M de X / 50 mU/ml de XOD durante 12, 18 y 24 horas, tras lo que se extrae el RNA y se realiza la RT-PCR en array, como se indica en Materiales y Métodos. En los distintos paneles de la figura se muestra en el eje de las ordenadas las veces que cambia la expresión del gen tras el tratamiento respecto a las células sin tratar y en el de las abscisas los diferentes tiempos, 12, 18 y 24 horas. Se indica el símbolo de cada gen cuya descripción se detalla en la tabla R.11.



ERE					EO				
Microarray			RT-PCR		Microarray			RT-PCR	
Gen	Expresión	Valor p	Expresión	I.C (95%)	Gen	Expresión	Valor p	Expresión	I.C (95%)
TAF1A	222.9	0.000	1.4	(0.74 - 2.61)	FLJ10120	13.0	0.2	6.3	(1.51 - 2.09)
DNAJB9	194	0.000	8.7	(6.07 - 12.5)	PLA2G3	8	0.000	6.3	(3.91 - 10.1)
FLJ10803	147	0.000	1.1	(0.86 - 1.34)	FLJ20171	4.9	0.45	-2	(-2.63 - (-1.56))
FLJ20171	137.2	0.000	7.6	(6.27 - 9.21)	INSIG1	4	0.000	-	-
TAC1	68.6	0.002	27.7	(20.6 - 37.3)	CDH2	3.5	0.58	-	-
Hs00290118	59.7	0.002	16.5	(14.3 - 18.9)	CLCN6	3.25	0.000	3.6	(3.35 - 3.78)
DNAJC3	39.4	0.000	15.7	(13.7 - 17.9)	NEU1	2.8	0.000	2.8	(2.00 - 3.95)
SDF2L1	27.9	0.000	59.4	(45.6 - 77.4)	HMGCR	2.8	0.000	3.7	(2.55 - 5.29)
MGC11256	16	0.000	16.2	(13.4 - 19.4)	EBP	2.8	0.000	2.96	(2.13 - 4.11)
TRA1	12.1	0.000	15.8	(13.4 - 18.6)	ALDOC	2.8	0.000	2.1	(1.47 - 3.03)
DSC1	7.5	0.003	3.3	(2.89 - 3.72)	SC4MOL	2.6	0.000	4.2	(1.94 - 9.28)
MYH13	2.6	0.17	1.8	(0.60 - 5.48)	SCD	2.0	0.000	2.9	(1.97 - 4.28)
NEB	2.1	0.015	2.1	(1.35 - 3.36)	IGFBP7	1.6	0.15	1.5	(1.19 - 1.79)
RGS5	2	0.5	2.3	(1.29 - 4.13)	APOE	1.5	0.000	2.3	(2.23 - 2.38)
CREB3	2	0.002	1.9	(1.44 - 2.46)	MGC11256	1.4	0.000	1.6	(1.31 - 2.01)
PIG11	-5.66	0.000	1.1	(1.00 - 1.26)	HYOU1	1.4	0.002	1.4	(-1.23 - 2.31)
IGF1	-3.48	0.000	-1.58	(-2.04 - (-1.22))	TRA1	1.3	0.000	1.3	(-1.22 - 1.94)
GSTM4	-1.87	0.001	1.01	(-2 - 2.03)	DNAJB9	1.3	0.02	1.6	(1.20 - 2.09)
FLJ12606	-2.00	0.001	1.27	(1.11 - 1.45)	EREG	-20	0.001	-	-
APOE	-1.62	0.017	-1.26	(-1.43 - (-1.11))	CNGB3	-20	0.001	-	-
LGALS1	-1.52	0.584	-1.59	(-6.46 - 2.55)	KCNQ4	-20	0.000	1.26	(-3.03 - 4.87)
ALDOC	-1.32	0.000	-5.42	(-6.23 - (-4.72))	RNF18	-9	0.001	1.22	(1.00 - 1.50)
KCNQ4	-1.23	0.047	1.19	(-1.58 - 2.24)	NLGN1	-6	0.000	-1.12	(-1.52 - 1.19)
ABCD2	-1.15	0.253	-2.03	(-2.32 - (-1.51))	TRPC1	-5	0.04	1.4	(1.19 - 1.65)
					GSTM4	-3	0.000	-1.18	(-1.82 - 1.33)
					LGALS1	-3	0.19	-1.85	(-4.76 - 1.41)
					DSC1	-3	0.003	-2.78	(-3.13 - (-2.44))
					PTPN22	-2	0.02	-1.27	(-2.22 - 1.39)
					CREB1	-2	0.000	-1.27	(-1.72 - 1.07)

**Tabla R.12. Comparación del cambio de la expresión génica analizado por Microarray de cDNA o por RT-PCR en array.** Se indican las veces que cambia la expresión del gen tras el tratamiento con Tm o con X-XOD durante 18h, respecto a la expresión sin tratamiento, con el intervalo de confianza al 95% entre paréntesis. Se representan en rojo o en azul (sobrexpresión o represión) los datos en los que no se ha conseguido el mismo resultado en la RT-PCR en array y en el Microarray de cDNA y con un guión (-) aquellos en los que no se ha amplificado el fragmento génico. Los genes se denotan por su símbolo y su descripción se detalla en la tabla R.11, en las que se resumen sus características funcionales.

#### 4.4.1.3. Análisis funcional de los genes sobreexpresados y reprimidos.

Además de hacer una clasificación de los genes en función de su grado de expresión, tal y como hemos descrito en el apartado anterior, también podemos hacerla por su función celular; usando la distribución de funciones asignada en la base de datos “Gene Ontology” (GO) (tablas R.13 y R.14). Así, obtenemos que aproximadamente el 30% de los genes o secuencias génicas cuya expresión cambia tras el tratamiento son desconocidos o no se conoce su función celular. Entre los genes con cambios en su expresión y que poseen función celular conocida destacan: los responsables de la respuesta a estrés, del transporte del RE al Golgi y de la respuesta a mal plegamiento de proteínas para el modelo de ERE; la biosíntesis del colesterol, el metabolismo, el metabolismo de lípidos y la proliferación celular para el modelo de EO; y la regulación negativa de la biosíntesis de proteínas para los tres modelos celulares.

En un primer análisis de los resultados obtenidos del estudio funcional de los cambios en la expresión génica en el neuroblastoma SKNMC podemos deducir lo siguiente:

-Si agrupamos los genes sobreexpresados y hacemos un enriquecimiento de la categoría G0 (tabla R.13), podemos ver que los procesos biológicos más alterados no coinciden en los tres modelos; sin embargo, hay un único componente celular sobreexpresado y coincidente para los tres tratamientos que es el RE, y una función molecular que es la actividad isomerasa.

-Si analizamos el ERE en presencia de EO frente al ERE, podemos ver que, prácticamente, los procesos biológicos sobreexpresados en el ERE coinciden cuando el ERE se encuentra en presencia de EO, excepto en el transporte del RE al Golgi y en el arresto del ciclo celular. Si lo que analizamos son los componentes celulares, los únicos que aparecen en ERE y no en ERE+EO son los del lumen del RE y componentes

extracelulares; mientras que para las funciones moleculares tenemos que las actividades de ubiquitin-ligasas, ligasas, correpresores y represores transcripcionales, sólo se incrementan para el ERE y no en ERE+EO.

-Si analizamos el EO frente al ERE+EO podemos ver que ninguno de los procesos biológicos sobreexpresados para EO están alterados en el caso de ERE+EO.

-Si lo que agrupamos son los genes reprimidos y, como antes, hacemos un enriquecimiento de la categoría G0 (tabla R.14), podemos ver que el único proceso biológico reprimido, que es coincidente en los tres modelos, es la biosíntesis de proteínas; y los genes del poro nuclear el único componente celular reprimido y coincidente. Por funciones moleculares, los genes implicados en la ligación del RNA, la actividad de transporte de proteínas y la actividad de las chaperonas, serían los reprimidos en los tres modelos (ERE, EO y ERE+EO).

-Si analizamos el ERE frente al ERE en presencia de EO, podemos ver que todos los procesos biológicos reprimidos en el ERE lo están también cuando a este estrés lo ponemos en presencia de EO. Sin embargo, los componentes celulares como son componentes intracelulares, membrana y la subunidad citosólica ribosomal larga, sólo se encuentran reprimidos en el ERE y no en ERE+EO; como ocurre también en las funciones moleculares para el constituyente estructural del ribosoma y la actividad de factores de crecimiento.

-Si analizamos el EO frente al ERE+EO podemos ver que procesos biológicos como el transporte de proteínas, el ciclo celular, la mitosis, el ensamblamiento del complejo proteico y el transporte intracelular de proteínas, solamente se encuentran reprimidos en el caso del EO y no en el de ERE+EO.

	EO	ERE	ERE+EO
Procesos biológicos	Biosíntesis del colesterol (22) Metabolismo (17) Metabolismo de lípidos (15) Proliferación celular (14)	Transporte(45) Transporte de proteínas intracelulares (39) Plegamiento de proteínas (36) Transducción de señales mediada por small GTPasa (25) Transporte de proteínas (22) Respuesta a estrés (13) Metabolismo de aminoácidos (13) Desarrollo(12) Transporte del ER al Golgi (11) Arresto del ciclo celular (10)	Transporte (54) Transporte de proteínas intracelulares (42) Plegamiento de proteínas (35) Transducción de señales mediada por small GTPasa (27) Transporte de proteínas (24) Metabolismo de carbohidratos (20) Desarrollo(19) Respuesta inmune (17) Metabolismo de aminoácidos (17) Respuesta a estrés (16) Proteólisis y peptidólisis (16) Transporte de aminoácidos (16) N-linked glycosylation (11) Transporte de cloruros (10)
Componentes celulares	Integrantes de membrana (67) Retículo endoplásmico (28) Fracción de membrana (24) Lisosoma (19)	Citoplasma (83) Retículo endoplásmico (69) Aparato de Golgi (46) Membrana plasmática (30) Microsoma (15) Lumen del RE (15) Extracelular (10)	Integrantes de membrana (166) Citoplasma (87) Retículo endoplásmico (87) Membrana (72) Aparato de Golgi (56) Membrana plasmática (36) Fracción soluble (30) Lisosoma (24) Microsoma(17) Membrana del RE (12)
Funciones moleculares	Actividad oxidoreductasa (32) Ligación al ión magnesio (13) Actividad isomerasa (10)	Ligación de GTP (35) Actividad de transporte de electrones (31) Actividad de chaperonas (29) Actividad de GTPasas (29) Actividad de proteínas ubiquitin-ligasas (28) Actividad isomerasa (20) Actividad de transporte de proteínas (18) Actividad de Ligasas (17) Actividad de correpresores de la transcripción (15) Actividad de proteínas disulfuro isomerasas (10) Actividad de represores transcripcionales (10)	Ligación del ión calcio (57) Actividad de transporte de electrones (36) Ligación de GTP (34) Actividad de chaperonas (31) Actividad de GTPasas (27) Actividad isomerasa (23) Actividad de transporte de proteínas (16) Actividad de proteínas disulfuro isomerasas (11) Actividad de aminoácidos permeasas (10)

**Tabla R.13. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes sobreexpresados.** Las categorías son solamente funcionales incluyéndose aquellas que al menos contengan 10 genes y p-valores menores que 0.01. Se muestran en rojo las que son coincidentes en los tres modelos y en verde las no coincidentes entre el modelo de ERE o de EO con ERE+EO.



	EO	ERE	ERE+EO
<b>Procesos biológicos</b>	Biosíntesis de proteínas (30) Transporte de proteínas (20) Ciclo celular (16) Procesamiento del mRNA nuclear, vía spliceosoma (14) Mitosis (13) Ensamblamiento del complejo proteico (13) Transporte intracelular de proteínas (13) Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina (12) Plegamiento de proteínas (12) Reparación del DNA (11) Procesamiento del rRNA (11)	Biosíntesis de proteínas (30) Regulación del ciclo celular (22) Replicación del DNA (18) Movimiento basado en microtúbulos (11) Movilidad celular (10) Polimerización de microtúbulos (10)	Regulación del ciclo celular (36) Biosíntesis de proteínas (35) Replicación del DNA (32) Procesamiento del mRNA nuclear, vía spliceosoma (20) Plegamiento de proteínas (19) Procesamiento del RNA (18) Movilidad celular (17) Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina (17) Reparación del DNA (15) Respuesta inmune (15) Desarrollo del esqueleto (15) Polimerización de microtúbulos (13) Movimiento basado en microtúbulos (13) Procesamiento del rRNA (11) Glucólisis (10)
<b>Componentes celulares</b>	Núcleo (167) Citoplasma (74) Integrantes de membrana (30) Integrantes de membrana plasmática (30) Fracción soluble (22) Para nuclear (15)	Mitochondria (29) Intracelular (28) Ribosomas (17) Membrana (15) Citosol (13) Subunidad citosólica ribosomal larga (sensu Eukarya) (10) Tubulina (10) Para nuclear (10)	Núcleo (240) Citoplasma (91) Mitochondria (73) Integrantes de la membrana plasmática (43) Citosol (21) Ribosomas (18) Para nuclear (16) Tubulina (13) Complejo ribonucleoproteico (12) Aparato de Golgi (10) Nucleolo (10)
<b>Funciones moleculares</b>	Ligación de ATP (90) Actividad transferasa (61) Ligación del RNA (41) Ligación de ácidos nucleicos (32) Actividad de factores de transcripción (23) Actividad ligasa (21) Actividad de transporte de proteínas (15) Actividad del factor de procesamiento pre-mRNA (13) Actividad de chaperonas (12) Actividad del factor de iniciación de la translocación (12) Actividad liasa (10)	Ligación del RNA (37) Constituyente estructural del ribosoma (24) Ligación de GTP (23) Actividad GTPasa (18) Actividad de factores de crecimiento (13) Actividad de chaperonas (10) Actividad de transporte de proteínas (10) Actividad de receptores (10)	Ligación de RNA (69) Zinc ion binding (41) Actividad de factores de transcripción (41) Actividad oxidoreductasa (39) Ligación de GTP (32) Componentes estructurales del ribosoma (23) Actividad de chaperonas (22) Actividad GTPasa (21) Actividad receptora (20) Actividad ligasa (19) Actividad de transporte de proteínas (19) Componentes estructurales del citoesqueleto (18) Ligación de nucleótidos (17) Actividad del factor de procesamiento del pre-mRNA (16) Actividad del factor de iniciación de la traducción (14) Actividad motora (11) Actividad de las proteínas Heat shock (10)

**Tabla R.14. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes reprimidos.** Las categorías son solamente funcionales incluyéndose aquellas que al menos contengan 10 genes y p-valores menores que 0.05. Se muestran en azul las que son coincidentes en los tres modelos y en verde las no coincidentes entre el modelo de ERE o de EO con ERE+EO.

#### 4.4.1.4. Análisis y selección de genes candidatos a estudios funcionales.

De los genes estudiados por Microarray de DNA (Genechip Affymetrix) y confirmados por RT-PCR en array, seleccionamos algunos de los genes que destacaban tanto por su nivel de expresión como por su importancia funcional. Así, en el modelo de EO, el proceso biológico más regulado positivamente es el metabolismo del colesterol y, entre los genes más sobreexpresados se encuentran, la fosfolipasa A2 grupo III secretada (PLA2G3) y la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), ambos implicados (en mayor o menor medida) en este proceso biológico.

En el modelo de ERE, observamos que entre las 30 secuencias génicas más sobreexpresadas, 13 de ellas codifican para proteínas desconocidas. Destaca la proteína hipotética MGC11256, que también está sobreexpresada en el modelo de ERE+EO (6 veces) y en el de EO (1.4 veces).

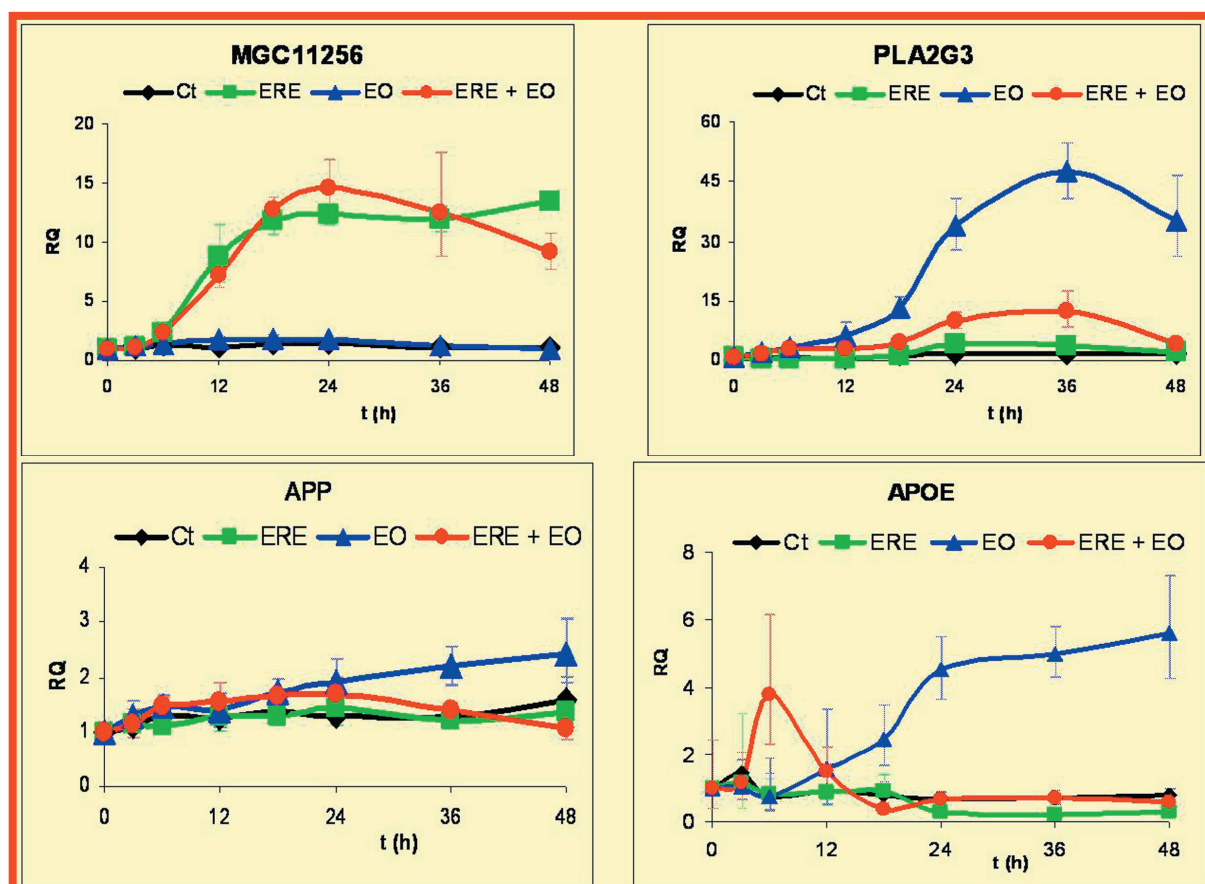
Entre los genes más sobreexpresados del modelo de ERE y ERE+EO destacan; el homólogo a DnaJ (Hsp40) subfamilia B miembro 9 (DNAJB9), la proteína reguladora del oxígeno de 150KDa (ORP150/HYOU1), la proteína reguladora de la glucosa de 94KDa (Grp94/TRA1), la proteína quinasa activadora del RNA de doble cadena relacionada con el RE (PERK/EIF2AK3) y la proteína reguladora de la glucosa de 78KDa (Grp78/Bip/HSPA5). Otro de los genes seleccionados por su implicación en la apoptosis vía RE, y que está entre los genes más sobreexpresados, tanto en el modelo de ERE como en el de ERE+EO, es la proteína homóloga a C/EBP (CHOP/GADD153/DDIT3).

Sobre estos genes seleccionados se realizó un estudio de asociación genética en el laboratorio por

la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Bullido y Ana Martínez (Tesis doctoral de Ana Martínez en desarrollo) que está basado en el análisis de SNPs (polimorfismos de un sólo nucleótido) que por el momento nos han mostrado una asociación clara en la PLA2G3, una tendencia en MGC11256, ambos en la muestra general, y haciendo discriminación por factores de riesgo vemos que CHOP está fuertemente asociado a EA en individuos mayores de 85 años.

Debido a su sobreexpresión en alguno de los modelos celulares de estrés, así como por su asociación a EA, decidimos hacer un curso temporal amplio de la expresión de los mRNAs (RT-PCR en array) de los genes de PLA2G3 y MGC11256; y a la vez, de los genes de dos proteínas implicadas en dicha patología: ApoE y APP.

Como podemos ver en la figura R.32.a, el mRNA de MGC11256 está sobreexpresado a partir de las 6h de tratamiento tanto en el modelo de ERE como en el de ERE+EO, llegando a un máximo de unas 12 veces, respecto al control; y reduciéndose en ERE+EO a partir de las 24h de tratamiento. En el caso de PLA2G3 (fig.R.32.b) el mRNA está sobreexpresado en EO a partir de las 12h de tratamiento, llegando a un máximo de unas 45 veces respecto al control a las 36h; en ERE+ EO también se llega a un máximo de 10 veces a las 36h. En la figura R.32.c, podemos ver como el mRNA de APP no varía su expresión salvo en el modelo de EO y a las 36h de tratamiento (2 veces el control). En el mRNA de APOE (fig.R.32.d), podemos observar en ERE+EO un pico de activación temprano (4 veces a las 6h) que desaparece a partir de las 18h de tratamiento; sin embargo, en EO, se sobreexpresa a partir de las 12h, hasta un máximo de 6 veces respecto al control, a las 48h de tratamiento.



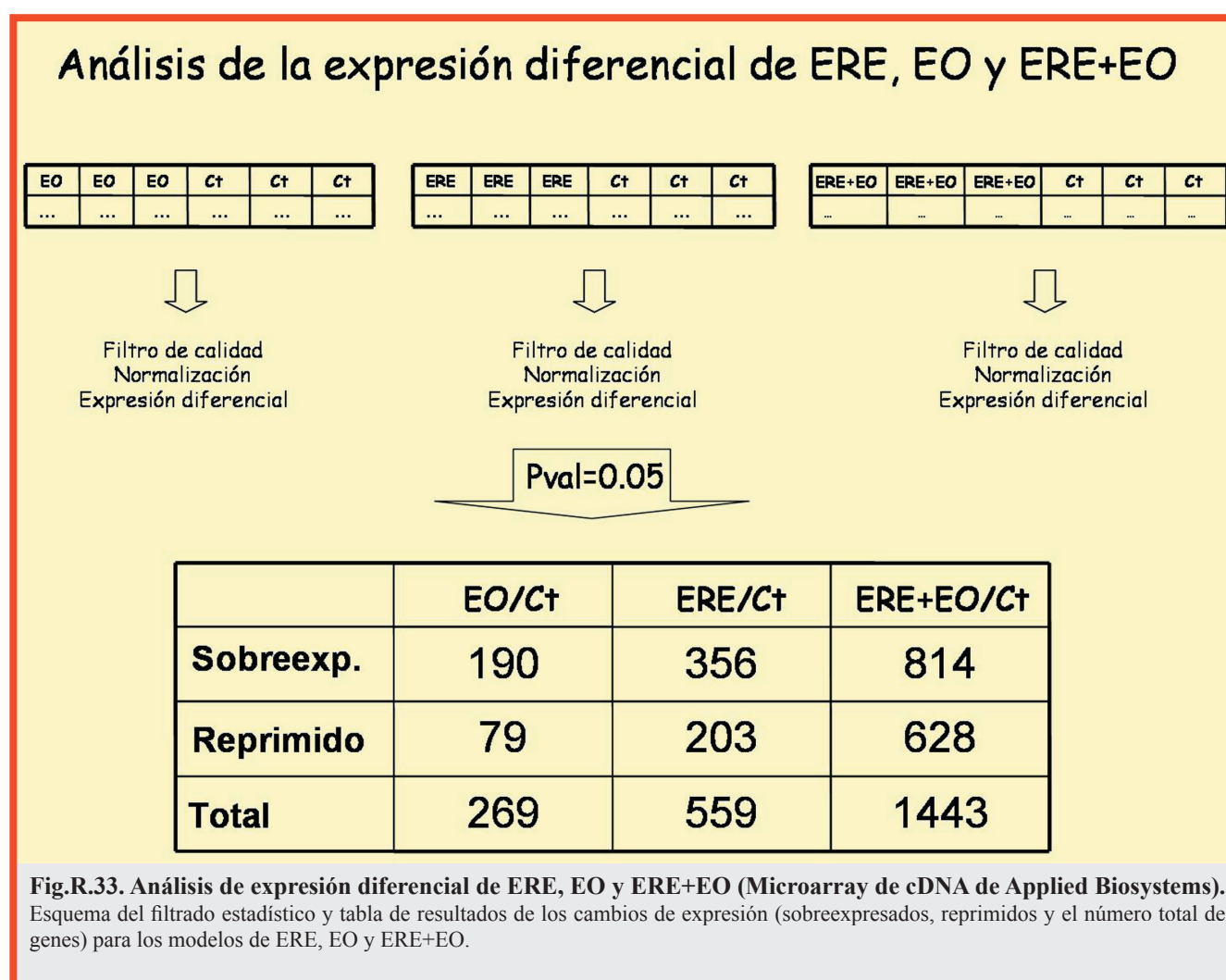
**Fig.R.32. Estudio cinético de la expresión génica en SKNMC: genes de interés.** Las células SKNMC fueron tratadas con Tm 2.5 µg/ml, X 10 µM / X-XOD 50 mU/ml y con ambos simultáneamente durante 0, 3, 6, 12, 18, 24, 36 y 48h, tras lo que se extrae el RNA y se realiza la RT-PCR en array, como se indica en el apartado 4.11 de Materiales y Métodos. En los distintos paneles se muestra en el eje de ordenadas las veces que cambia la expresión del gen tras los tratamientos respecto a las células control, y en el de abscisas los diferentes tiempos (h). Se indica el símbolo de cada gen cuya descripción se detalla en el texto.

#### 4.4.2. Análisis genómico funcional mediante Microarrays de DNA (Applied Biosystems).

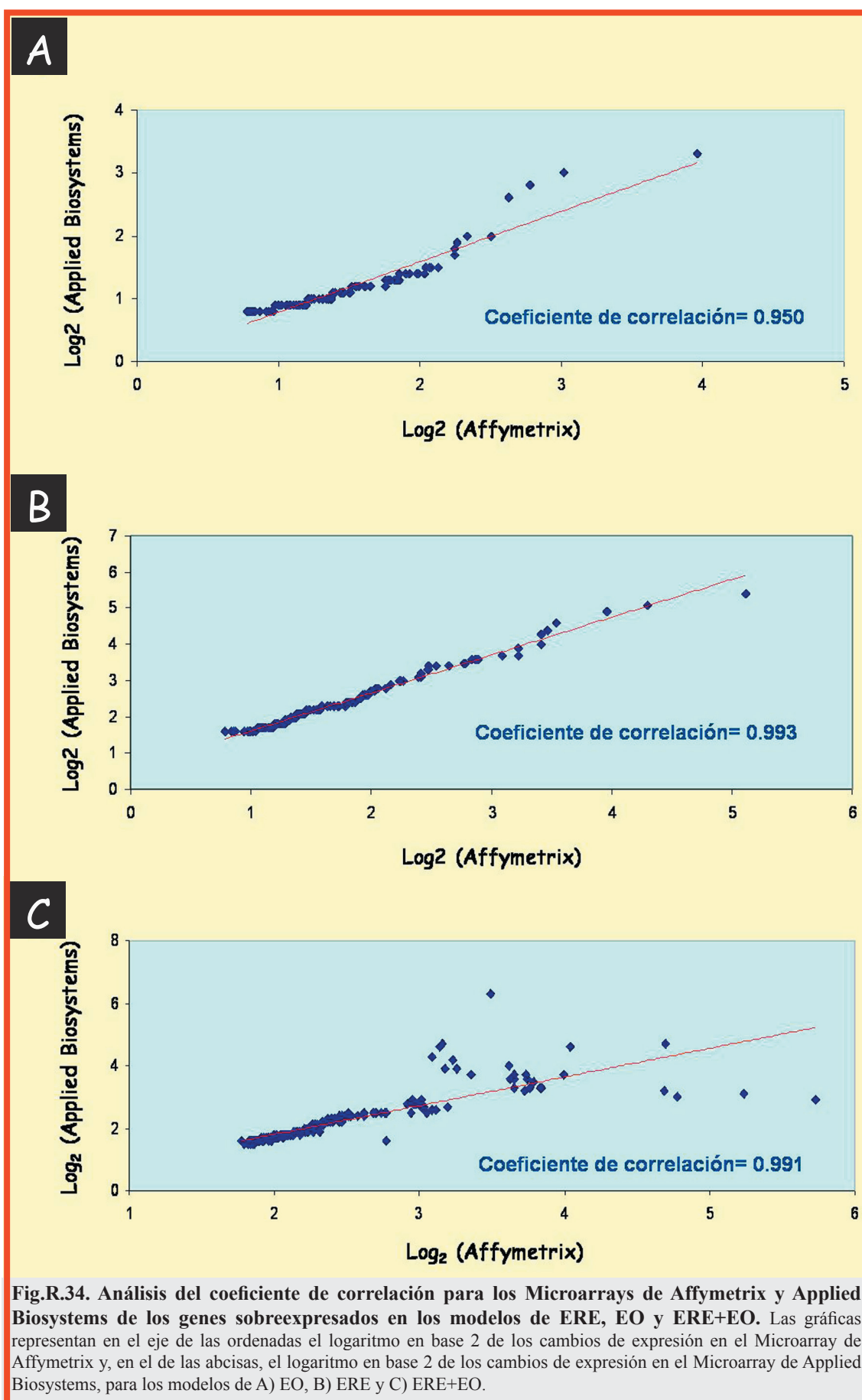
Como los estudios funcionales del Microarray de DNA de Affymetrix se habían realizado sobre un único experimento, decidimos confirmarlos realizando de un triplicado experimental un análisis más exhaustivo de los procesos biológicos más alterados utilizando los Microarrays de DNA de Applied Biosystems. Para ello realizamos tres ensayos distintos a un tiempo fijo de 18h con cada uno de los tratamientos de estrés, utilizando cultivos celulares de SKNMC en diferente número de pase (fig.R.33).

##### 4.4.2.1. Análisis funcional de los modelos de EO, ERE y ERE+EO.

Del análisis de la expresión génica mediante Microarray de DNA de los modelos de EO, ERE y ERE+EO obtuvimos que, después de analizar el genoma completo, aproximadamente 270 secuencias génicas para EO, 550 para ERE y 1400 para ERE+EO (Fig. R.33) variaban su expresión más de 1,3 veces respecto a las células control.



En el análisis comparativo del Microarray de Affymetrix con los de Applied Biosystems (fig.R.34), se llevó a cabo representando los cambios de expresión de los genes sobreexpresados en Affymetrix, frente a los cambios de los genes sobreexpresados en Applied Biosystems. Como se puede observar existía una buena correlación entre ambos Microarrays en los tres modelos.





Además, realizamos un análisis funcional usando las plataformas de Gene Ontology (G0) y Panther, obteniendo las rutas de señalización y los procesos biológicos que variaban su expresión en cada uno de los modelos, así como los genes implicados en los procesos más sobreexpresados (tablas R.17, R.20 y R.23). De este análisis deducimos que:

- En **el modelo de EO** (Tabla.R.15) sólo los procesos de: el metabolismo de lípidos, ácidos grasos y esteroides y el transporte lisosomal están también sobreexpresados en ERE+EO. La biosíntesis del colesterol o la ruta de las presenilinas (por ejemplo) sólo se encuentran alteradas en el modelo de EO.
- En **el modelo de ERE** (tabla.R.17), la mayoría de los procesos biológicos y rutas sobreexpresados son coincidentes con los de ERE+EO. Entre los no coincidentes encontramos: la ruta de señalización de integrinas, el transporte de vesículas, el metabolismo del RNA transferente o la homeostasis del calcio, que sólo se sobreexpresan en ERE.
- Entre las rutas que sólo aparecen sobreexpresadas en **el modelo de ERE+EO** (tabla.R.19) encontramos: la ruta de señalización del receptor nicotínico de la acetilcolina, la respuesta a estrés oxidativo y la ruta de señalización de la apoptosis.
- Entre los procesos biológicos que sólo aparecen sobreexpresados en **el modelo de ERE+EO** (tabla.R.19) están: el transporte y, en concreto, el transporte de proteínas, la localización y dianas de proteínas, el metabolismo de aminoácidos, la estructura celular y la endocitosis.
- En los tres modelos un gran número de genes sobreexpresados codifican para proteínas desconocidas o con función biológica desconocida. En las rutas sobreexpresadas ninguna coincide para los tres modelos.
- En **el modelo de EO** (tabla.R.16) la mitad de los procesos biológicos reprimidos lo están también en ERE+EO, tales como el transporte intracelular de proteínas o el metabolismo del Acil-CoA. Entre las no coincidentes en los dos modelos encontraríamos por ejemplo; la transferencia de radicales libres y antioxidación, el transporte de vesículas, la enfermedad de Huntington, el sistema cardíaco, procesos inmunes o los receptores externos mediadores de la transducción de señales, que sólo se reprimen en EO.
- Cuando lo que analizamos es **el modelo de ERE** (tabla R.18), la mayoría de las rutas y procesos biológicos reprimidos son coincidentes con los reprimidos en ERE+EO: la ruta del ubiquitin proteasoma, la ruta de señalización de Hedgehog, la regulación del citoesqueleto por la Rho GTPasa, la señalización de FAS, la ruta de p53, el metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos, el transporte nuclear, la fosforilación de proteínas, la proteólisis, metabolismo del DNA o la transcripción entre otros. Mientras que rutas como la enfermedad de Huntington o la angiogénesis, sólo están reprimidas en ERE.
- En **la coexistencia de estreses, ERE+EO** (tabla R.20), los procesos biológicos reprimidos no coincidentes con ninguno de los modelos individuales son: replicación del DNA, enfermedad de Parkinson, metabolismo de pirimidinas, movilidad celular, procesamiento del mRNA, renovación de antioxidantes y radicales libres, estructura celular, oncogénesis, señalización mediada por calcio, metabolismo de carbohidratos, reparación del DNA, dianas de proteínas, plegamiento de proteínas, diferenciación y proliferación celular.
- Si lo que analizamos son las funciones reprimidas coincidentes en los tres modelos encontramos: el ciclo celular, la segregación cromosómica, la mitosis y la citoquinesis.

#### 4.4.2.2. Análisis de la expresión génica de las rutas de la RIE mediante Microarray de DNA.

En el desarrollo de los modelos celulares de EO, ERE y ERE+EO, hemos estudiado y caracterizado varias vías de señalización tales como; la UPR, la homeostasis del calcio y la apoptosis. Con el fin de analizar más en profundidad estas vías, analizamos la variación en el grado de expresión de los genes implicados utilizando el Microarray de DNA de Applied Biosystems.

##### a) La respuesta integrada a estrés (RIE).

Como hemos visto en el apartado 3.2.1 de Resultados, uno de los procesos sobreexpresados tanto en ERE como en ERE en presencia de EO es la respuesta integrada a estrés. Por esta razón, decidimos analizar en el Microarray de DNA los genes cuya implicación en esta respuesta está ampliamente aceptada.

Ruta	P-value
Biosíntesis del colesterol	3.52E-14
Ruta de las presenilinas -EA	1.47E-02
p53 pathway feedback loops 2	7.76E-02
Ruta de señalización de Wnt	9.92E-02

Procesos biológicos	P-value
Metabolismo de lípidos, acs. grasos y esteroides	5.82E-15
Metabolismo del colesterol	1.76E-12
Metabolismo de esteroides	5.14E-11
Otros metabolismos de esteroides	6.37E-05
Otros metabolismos	2.44E-04
Oogénesis	1.18E-03
Metabolismo de acs. grasos	1.26E-03
Transporte lisosomal	3.53E-03
Metabolismo de grupos prostéticos y coenzimas	4.07E-03
Metabolismo de coenzimas	5.84E-03
Inmunidad mediada por MHCI	6.37E-03
Transporte de acs. grasos y lípidos	8.62E-03
No clasificados	1.11E-02

Tabla R.15. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes sobreexpresados en EO. Las categorías son sólo funcionales incluyéndose aquellas con p-values menores de 0.05. Se muestran en rojo las que son coincidentes en los tres modelos y en verde las no coincidentes entre EO y ERE+EO.

Ruta	P-value
Enfermedad de Huntington	1.79E-04
Circadian clock system	4.76E-02
Cascada de activación del plasminógeno	5.25E-02

Procesos biológicos	P-value
Tráfico intracelular de proteínas	1.22E-03
Citoquinesis	3.18E-03
Mitosis	3.35E-03
Transferencia de radicales libres y antioxidación	5.35E-03
Transporte general de vesículas	7.34E-03
Receptores externos mediadores de la transducción de señales	1.26E-02
Inmunidad mediada por el interferón	1.31E-02
Ciclo celular	1.35E-02
Otros metabolismos	1.54E-02
Detoxificación	1.66E-02
Transducción de señales	1.82E-02
Procesos biológicos no clasificados	2.16E-02
Segregación cromosómica	3.07E-02
Endocitosis	3.83E-02
Inmunidad mediada por macrófagos	5.00E-02
Metabolismo del Acyl-CoA	5.73E-02

Tabla R.16. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes reprimidos en EO. Las categorías son sólo funcionales incluyéndose aquellas con p-values menores de 0.05. Se muestran en azul las que son coincidentes en los tres modelos y en verde las no coincidentes entre EO y ERE+EO.



Ruta	P-value
Enfermedad de Parkinson	9.85E-03
Ruta de Ras	3.41E-02
Ruta de señalización de integrinas	4.22E-02
Dirección axónica mediada por semaforinas	4.29E-02
Biosíntesis del antígeno-O	6.86 E-02

Procesos biológicos	P-value
Plegamiento de proteínas	5.81E-14
Tráfico intracelular de proteínas	6.45E-14
No clasificados	4.77E-12
Reacción de la proteína disulfuro isomerasa	7.27E-12
Transporte general de vesículas	2.90E-08
Exocitosis constitutiva	5.24E-08
Modificación y metabolismo de proteínas	1.15E-07
Metabolismo de carbohidratos	1.60E-06
Otros metabolismos de polisacáridos	1.91E-06
Modificación de proteínas	2.17E-06
Glicosilación de proteínas	4.61E-06
Exocitosis	9.33E-06
Respuesta a estrés	3.79E-05
Catabolismo de vitaminas	6.93E-05
Metabolismo de monosacáridos	3.97E-04
Homeostasis del ión calcio	1.18E-03
Desarrollo del ectodermo	2.56E-03
Metabolismo del RNA transferente	3.16E-03
Otros tráfico intracelulares de proteínas	5.64 E-03
Inmunidad y defensa	1.98 E-03

Tabla R.17. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes sobreexpresados en ERE. Las categorías son sólo funcionales incluyéndose aquellas con p-values menores de 0.05. Se muestran en rojo las que son coincidentes en los tres modelos y en verde las no coincidentes entre ERE y ERE+EO.

Ruta	P-value
Ruta del ubiquitin proteasoma	7.38E-10
Ciclo celular	4.15E-06
No clasificado	6.99E-05
Ruta de señalización de Hedgehog	5.12E-04
Ruta de p53	9.61E-03
Regulación del citoesqueleto por la Rho GTPase	1.31E-02
p53 pathway feedback loops 2	1.31E-02
Ruta de señalización de FAS	2.87E-02
Ruta que media la ruta de señalización de las proteínas G heterotrimérica -Gi y Gs α	3.84E-02
Ruta de señalización de prot.G heterotrimérica -rod fuera del segmento de fototransducción	4.30E-02
Enfermedad de Huntington	4.41E-02
Angiogénesis	8.03E-02

Procesos biológicos	P-value
Segregación cromosómica	5.11E-13
Ciclo celular	1.88E-11
Mitosis	1.96E-11
No clasificados	1.44E-08
Metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y acs. nucleicos	1.46E-04
Procesos de desarrollo mental	1.80E-04
Transporte nuclear	2.99E-04
Metabolismo y modificación de proteínas	4.84E-04
Fosforilación de proteínas	6.91E-04
Modificación de proteínas	8.06E-04
Citoquinesis	9.65E-04
Proteólisis	1.62E-03
Control del ciclo celular	1.68E-03
Regulación de la transcripción del mRNA	1.74E-03
Ruta de señalización del receptor de la serin/treonin quinasa	3.17E-03
Metabolismo del DNA	4.56E-03
Dianas de proteínas y localización	4.81E-03
Transcripción del mRNA	5.95E-03

Tabla R.18. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes reprimidos en ERE. Las categorías son sólo funcionales incluyéndose aquellas con p-values menores de 0.05. Se muestran en azul las que son coincidentes en los tres modelos y en verde las no coincidentes entre ERE y ERE+EO.

Ruta	P-value
Ruta de Ras	2.03E-03
Ruta de señalización del receptor nicotínico de la acetilcolina	5.47E-03
Biosíntesis del antígeno-O	1.16E-02
Respuesta a estrés oxidativo	1.49E-02
Ruta de señalización de la apoptosis	1.85E-02
Dirección axónica mediada por semaforinas	3.21E-02
Enfermedad de Parkinson	5.34E-02

Procesos biológicos	P-value
No clasificados	6.18E-28
Tráfico intracelular de proteínas	3.50E-19
Plegamiento de proteínas	4.04E-12
Transporte general de proteínas	1.90E-11
Reacción de la proteína disulfuro-isomerasa	4.99E-10
Exocitosis constitutiva	8.79E-10
Modificación y metabolismo de proteínas	7.71E-09
Glicosilación de proteínas	1.20E-07
Modificación de proteínas	1.26E-07
Metabolismo de carbohidratos	9.94E-07
Metabolismo de lípidos, acs. grasos y esteroides	2.68E-06
Transporte	6.45E-06
Exocitosis	7.01E-06
Metabolismo de otros polisacáridos	1.44E-05
Localización y dianas de proteínas	3.02E-05
Metabolismo de monosacáridos	8.81E-05
Respuesta a estrés	1.57E-04
Catabolismo de proteínas	3.52E-04
Transporte lisosomal	6.08E-04
Metabolismo de aminoácidos	7.24E-04
Estructura celular	1.54E-03
Endocitosis mediada por receptor	1.57E-03
Otros metabolismos de carbohidratos	1.82E-03
Endocitosis	2.47E-03
Desconocidas	4.26E-03
Procesos de desarrollo	4.78E-03
Desarrollo del ectodermo	5.36E-03

Tabla R.19. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes sobreexpresados en ERE+EO. Las categorías son sólo funcionales incluyéndose aquellas con p-values menores de 0.05. Se muestran en rojo las que son coincidentes en los tres modelos y en verde las no coincidentes entre ERE o EO y ERE+EO.



Ruta	P-value
Ruta del ubiquitin proteasoma	1.41E-09
Ciclo celular	9.10E-07
Ruta de señalización de Hedgehog	1.10E-03
Regulación del citoesqueleto por la Rho GTPasa	2.46E-03
No clasificados	3.08E-03
Replicación del DNA	6.39E-03
Enfermedad de Parkinson	3.87E-02
Ruta de p53	4.65E-02
Ruta de señalización de FAS	5.06E-02

Procesos biológicos	P-value
Ciclo celular	7.70E-22
Segregación cromosómica	1.83E-17
Mitosis	8.21E-15
Metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y acs. nucleicos	4.73E-10
No clasificados	9.42E-10
Metabolismo del DNA	1.35E-08
Replicación del DNA	1.18E-07
Control del ciclo celular	7.26E-07
Transporte nuclear	2.77E-06
Metabolismo de pirimidinas	7.49E-05
Modificación y metabolismo de proteínas	1.53E-04
Tráfico intracelular de proteínas	2.06E-04
Citoquinesis	6.67E-04
Movilidad celular	8.26E-04
Procesamiento del mRNA	1.30E-03
Procesos de desarrollo mental	1.39E-03
Renovación de antioxidantes y radicales libres	1.94E-03
Señalización mediada por proteínas G	1.97E-03
Ruta de señalización del receptor de serin/treonin quinasa	2.37E-03
Percepción sensorial	2.88E-03
Estructura celular	4.94E-03
Fosforilación de proteínas	5.26E-03
Oncogénesis	5.43E-03
Localización y dianas de proteínas	1.06E-02
Metabolismo del Acyl-CoA	1.24E-02
Movilidad y estructura celular	1.30E-02
Señalización mediada por calcio	1.37E-02
Metabolismo de carbohidratos	1.38E-02
Procesamiento del pre-mRNA	1.66E-02
Modificación de proteínas	2.04E-02
Reparación del DNA	2.11E-02
Regulación de la transcripción del mRNA	2.21E-02
Percepción quimicasensorial	2.39E-02
Proteólisis	2.47E-02
Diana de proteínas	2.77E-02
Otros metabolismos	2.77E-02
Plegamiento de proteínas	2.78E-02
Olfato	2.94E-02
Transcripción del mRNA	3.78E-02
Iniciación de la transcripción del mRNA	4.04E-02
Diferenciación y proliferación celular	4.71E-02

Tabla R.20. Enriquecimiento de las categorías GO en grupos de genes reprimidos en ERE+EO. Las categorías son sólo funcionales incluyéndose aquellas con p-valores menores de 0.05. Se muestran en azul las que son coincidentes en los tres modelos y en verde las no coincidentes entre ERE o EO y ERE+EO.

I. Activación de la respuesta vía IRE1 $\alpha$ : en la tabla R.21.A vemos que el mRNA de IRE1 $\alpha$  está sobreexpresado respecto al control en los tres modelos y, además, en ERE+EO su sobreexpresión es el doble respecto a ERE y EO por separado. Si analizamos la expresión de los genes implicados en esta vía para ERE+EO, observamos que la mayoría de los genes se sobreexpresan al menos 1.5 veces el control o permanecen sin cambio; además, destaca la mayor sobreexpresión de dichos genes respecto al modelo de ERE. Sólomente están reprimidos dos de estos genes, ASK1/MAP3K5 y JUNB, ambos implicados en la vía de muerte dependiente de TRAF2. En EO, UBC7 (implicado en la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD)), se encuentra sobreexpresado, y CASP4 reprimido; estos genes que varían en EO permanecen sin cambios en los otros dos modelos.

II. Activación de la respuesta vía PERK: en los tres modelos está sobreexpresado el mRNA de PERK respecto al control (tabla R.21.B); y en ERE+EO 3 veces más que en EO y 1.5 veces más que en ERE. Cuando analizamos el resto de la vía, encontramos que la mayoría de los genes están sobreexpresados tanto en ERE como en ERE+EO, alcanzándose siempre en este último los niveles de expresión más altos. Lo mismo ocurre para el gen que aparece reprimido, la ciclina D1, que coincide en los modelos de ERE y ERE+EO, y en este último a un mayor nivel. Sólo en el caso de FBP (gen implicado en la autorregulación de la vía) que está sobreexpresado en EO, y de eIF2 $\alpha$ /EIF2S1 que se encuentra reprimido en el mismo modelo, permanecen sin cambios en ERE y en ERE+EO.

III. Activación de la respuesta vía ATF6: el mRNA de ATF6 se encuentra sobreexpresado en el modelo de convergencia de estreses (tabla R.21.C), permaneciendo sin cambios en los modelos individuales. Al analizar toda la vía dependiente de la activación de ATF6 vemos que todos los genes que se sobreexpresan en ERE lo hacen también en ERE+EO, y en este último en mayor medida. En EO, sólo aparecen sobreexpresados el gen de CHOP/DDIT3 (aunque sólo 1.5 veces) y de SREBP2 (proteína implicada en lipogénesis).

A	Gen	EO	ERE	ERE+EO
IRE1	ERN1	-1.14	-1.10	-1.19
		2.24	2.24	4.96
HAC1	TRIM3	1.00	-1.01	1.17
		1.38	1.81	1.43
XBP-1	XPB1	-1.37	5.43	5.69
RPD3-HDAC	HDAC2	1.03	-1.01	1.03
BIP	HSPA5	1.22	9.53	13.29
GRP94	TRA1	1.38	6.98	8.09
		1.44	5.06	5.46
PDI1	PADI1	1.06	-	-
EDEM	EDEM1	1.15	3.21	3.58
UBC7	UBE262	1.75	-1.16	1.22
		1.39	1.08	1.13
HRD1	SYVN1	1.43	5.27	9.05
TRAF2	TRAF2	1.31	1.28	1.09
ASK1	MAP3K5	-1.19	-1.25	-1.59
JNK	MAPK8	-1.02	-1.09	1.10
Jun	JUNB	-1.39	-1.54	-1.61
Caspasa12				
Caspasa 4	CASP4	-1.67	-1.01	-1.41
Caspasa 3	CASP3	-1.16	-1.18	-1.32
Caspasa 9	CASP9	1.13	2.06	2.96

<b>B</b>	<b>Gen</b>	<b>EO</b>	<b>ERE</b>	<b>ERE+EO</b>
PERK	EIF2AK3	1.60	4.25	5.31
eIF2 $\alpha$	EIF2S1	-1.50	-1.28	-1.45
Ciclina D1	CCND1	-1.39	-1.82	-2.33
		-1.27	-1.67	-2.08
ATF4	ATF4	-1.04	1.53	1.64
		1.06	1.37	1.44
Herp	HERPUD1	1.35	10.31	14.25
CHOP	DDIT3	1.55	7.78	12.53
ATF3	ATF3	1.04	1.55	2.13
GADD34	PPP1R15A	-1.05	2.67	5.55
TAT	TAT	-	-	-
PEPCK	PCK2	1.14	2.07	2.16
FBP	FBP1	2.53	1.23	1.06
NRF2	NFE2L2	1.02	-1.03	1.47

<b>C</b>	<b>Gen</b>	<b>EO</b>	<b>ERE</b>	<b>ERE+EO</b>
ATF6	ATF6	1.07	1.17	1.80
S1P	MBTPS1	1.26	1.21	1.19
S2P	MBTPS2	1.34	1.16	1.43
SREBP2	SREBF2	2.00	-1.27	1.42
Herp	HERPUD1	1.35	10.31	14.25
BIP	HSPA5	1.22	9.53	13.29
CHOP	DDIT3	1.55	7.78	12.53
P58IPK	DNAJC3	-1.14	10.89	12.35
XBP-1	XBP1	-1.37	5.43	5.69

**Tabla R.21. Cambio en la expresión génica de la respuesta UPR analizada por Microarray de cDNA.** Se indican las veces que cambia la expresión del gen en los modelos de EO, ERE y ERE+EO durante 18h de tratamiento, respecto a la expresión del cultivo control. En la tabla A se indican los genes implicados en la ruta mediada por IRE1 $\alpha$ ; en la tabla B los implicados en la ruta mediada por PERK; y en la tabla C los de la ruta mediada por ATF6. Todos los valores presentan un  $p < 0.05$ , los que tienen un  $p$  mayor o no se expresan aparecen representados con un guión (-). Los genes con una expresión  $>$  de 1.5 veces aparecen con fondo rojo y los  $<$  de -1.5 veces con fondo azul. Los valores negativos se presentan siempre con el color de fuente en azul.

## b) Señalización del calcio por el RE

Tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.3 de la Introducción, el RE es un almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  y es uno de los orgánulos más importantes para mantener la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Así pues, analizamos la expresión de los genes que codifican para los receptores encargados de la entrada y salida del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE y para sus respectivos ligandos (fig.I.8).



Cuando analizamos el modelo de convergencia de estreses, ERE+EO (tabla R.22), observamos que los genes que codifican para la bomba de reentrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al RE (SERCA) permanecen sin cambios, excepto la isoforma 2 (ATP2A2) la cual está sobreexpresada (ATP2A2 también se sobreexpresa en ERE y en EO, aunque en menor medida). Si analizamos la expresión de los receptores encargados de la salida del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, encontramos que el InsP3R está sobreexpresado claramente en ERE+EO y en ERE, y que las isoformas 1 y 2 del RyR están ligeramente sobreexpresados en EO. Los ligandos de estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  permanecen sin cambio respecto al control en todos los modelos.

	Gen	EO	ERE	ERE+EO
<b>SERCA</b>	ATP2A1	1.22	-	1.04
	ATP2A1	-1.1	-1.35	-1.08
	ATP2A2	1.56	2.31	3.28
	ATP2A3	1.22	1.41	1.28
<b>cADPR</b>	CD38	-	-	-
<b>PLC</b>	HSPG2	-1.18	-	-
<b>InsP3</b>	ITPKA	-1.22	1.07	-1.19
	ITPKC	1.17	1.42	1.14
<b>InsP3R</b>	ITPR1	1.64	5.18	6.51
<b>RyR</b>	RYR1	1.78	-	1.09
	RYR2	1.68	-1.50	1.13
	RYR3	-	-	-1.15

**Tabla R.22. Cambio en la expresión génica de la señalización del calcio en el RE analizada por Microarray de cDNA.** Se indican las veces que cambia la expresión del gen en los modelos de EO, ERE y ERE+EO durante 18h de tratamiento, respecto a la expresión del cultivo control. Todos los valores presentan un  $p < 0.05$ , los que tienen un  $p$  mayor o no se expresan aparecen representados con un guión (-). Los genes con una expresión  $>$  de 1.5 veces aparecen con fondo rojo y los  $<$  de -1.5 veces con fondo azul. Los valores negativos se presentan siempre con el color de fuente en azul.

Con estos resultados, podríamos decir que la vía de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE está activada en los tres modelos, EO, ERE y ERE+EO, a las 18h de tratamiento; y en cierta manera dicha activación está incrementada en ERE+EO.

### c) El incremento del calcio citosólico y la EOR.

Se requiere un balance de respuestas coordinadas para el mantenimiento de la supervivencia celular bajo condiciones de estrés. Cuando se produce la señal de estrés, hay una movilización del calcio intracelular que provoca un incremento del calcio citosólico y desencadena tanto la respuesta UPR como la respuesta EOR. Este incremento en el calcio citosólico también afecta a la mitocondria, que va a producir ROS favoreciendo así la activación de la respuesta EOR (vía NFkB). Como podemos observar en la tabla R.23.A, la respuesta antioxidante es muy dispar, ya que tenemos sobreexpresada la hemo-oxigenasa 1 (HMOX1) en los tres modelos, pero sobre todo en ERE+EO (más del doble); pero reprimida la superóxido dismutasa 1 (SOD1). Si observamos la familia de las quinasas Janus (JAKs), vemos que la JAK2 está sobreexpresada y JAK3 reprimida en los tres modelos, mientras que JAK1 se sobreexpresa en EO y se reprime en ERE y en ERE+EO.

Otra vía de activación de NFkB es a través de la activación de las calpaínas y, como podemos observar en la tabla R.23.B, estas se encuentran en su mayoría sin cambios, aunque también hay algunas ligeramente sobreexpresadas como la CAPN 1, 3, 5 y 10 en ERE+EO; la CAPN 13 y S2 en ERE; y la CAPN 3, 5 y S2 en EO.



A	Gen	EO	ERE	ERE+EO
SOD	SOD1	-2.13	-1.75	-5.83
PDTCT	HMOX1	4.95	4.22	10.59
JAK	JAK1	1.72	-2.20	-1.56
	JAK2	1.89	1.72	2.93
	JAK3	-5.78	-2.60	-7.45
		-1.18	-1.17	-1.23

B	Gen	EO	ERE	ERE+EO
CAPN1	CAPN1	1.28	1.13	1.65
CAPN2	CAPN2	-1.16	1.36	1.30
CAPN3	CAPN3	2.64	-	1.79
		-1.34	-1.47	1.74
CAPN5	CAPN5	2.01	1.19	2.01
CAPN6	CAPN6	-1.31	-1.26	-1.31
CAPN7	CAPN7	1.29	1.20	1.29
CAPN9	CAPN9	1.19	1.03	1.19
CAPN10	CAPN10	-1.11	-1.99	-1.23
		1.16	1.31	1.59
CAPN11	CAPN11	-	-	-1.37
CAPN12	CAPN12	1.05	-1.14	1.03
CAPN13	CAPN13	1.33	1.50	1.31
CAPN14	CAPN14	1.14	-1.12	-1.05
CAPN51	CAPN51	-1.04	-1.09	1.00
CAPN52	CAPN52	1.85	2.04	1.38

**Tabla R.23. Cambio en la expresión génica de la señalización EOR mediada por calcio analizada por Microarray de cDNA.** Se indican las veces que cambia la expresión del gen en los modelos de EO, ERE y ERE+EO durante 18h de tratamiento, respecto a la expresión del cultivo control. En el panel A se indican los genes implicados en la respuesta general; y en el panel B la variación en las calpainas. Todos los valores presentan un  $p < 0.05$ , los que tienen un  $p$  mayor o no se expresan aparecen representados con un guión (-). Los genes con una expresión  $>$  de 1.5 veces aparecen con fondo rojo y los  $<$  de -1.5 veces con fondo azul. Los valores negativos se presentan siempre con el color de fuente en azul.

#### d) La apoptosis mitocondrial.

Como podemos observar en la tabla R.24, en ERE+EO, todos los genes de las vías de muerte a 18h están reprimidos o no presentan ningún cambio respecto al control. Los únicos genes sobreexpresados son: AMID, una isoforma de la proteína AIF (que señala una ruta apoptótica independiente de caspasas; apartado 2.1.2 de la Introducción) y que también aparece sobreexpresada en ERE y EO (aunque en menor medida); y CASP9 que está también sobreexpresada en ERE.

Cuando analizamos la expresión génica de la familia Bcl2 en el modelo de ERE+EO, observamos que todos los genes permanecen sin cambios respecto al control, excepto los genes BIM y BID, que se reprimen (al igual que en ERE).

Según estos resultados, podríamos decir que en los tres modelos celulares, a 18h, parecen estar inhibidas aún todas las vías proapoptóticas mitocondriales, aunque la represión sería menor en ERE+EO.

A	Gen	EO	ERE	ERE+EO
BAD	BAD	-1.19	1.48	1.38
BAK	BAK1	-1.29	-1.02	-1.28
BAX	BAX	-1.20	1.03	-1.23
BID	BID	-1.11	-1.64	-1.64
BIM	BCL2L1	1.06	1.17	1.17
	BCL2L1	1.00	-1.01	-1.01
	BCL2L1	-1.46	-2.11	-2.11
BCL2	BCL2	-1.29	-1.21	-1.12
	BCL2	-1.07	1.36	1.44
BCL-XL	BCL2L1	1.02	-1.01	1.11
AIF	AMID	1.86	2.20	3.08
	AMID	1.25	1.15	1.19
	AIF1	-1.46	1.20	-1.92
	AIF1	-1.47	1.16	-2.00
	PDCD8	1.11	1.13	1.20
	PDCD8	1.13	1.42	1.38
Omi	PRSS25	1.13	1.00	1.16
smac/DIABLO	-	-1.40	-1.06	-1.13
citocromo c	CYC5	-1.16	1.00	-1.04
		-1.54	-1.04	-1.30
	CYC1	-1.20	-1.20	-1.32
	C21orf45	-1.42	-1.33	-1.68
XIAP	BIRC4BP	1.30	-1.17	1.00
Apaf1	APAF1	-1.09	1.09	1.07
caspasa 9	CASP9	1.13	2.06	2.96
caspasa 3	CASP3	-1.16	-1.18	-1.32

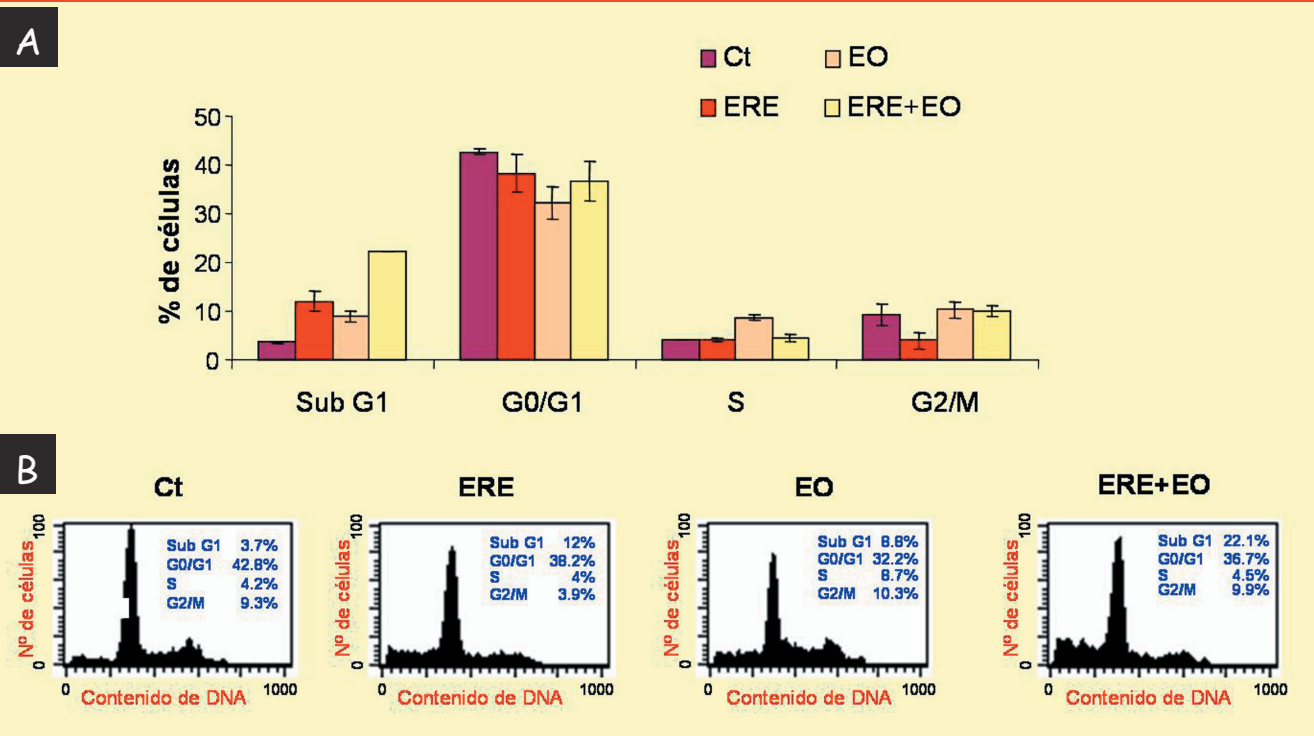
Tabla R.24. Cambio en la expresión génica de la ruta apoptótica mitocondrial analizada por Microarray de cDNA. Se indican las veces que cambia la expresión del gen en los modelos de EO, ERE y ERE+EO durante 18h de tratamiento, respecto a la expresión del cultivo control. Todos los valores presentan un  $p < 0.05$ , los que tienen un  $p$  mayor o no se expresan aparecen representados con un guión (-). Los genes con una expresión  $>$  de 1.5 veces aparecen con fondo rojo y los  $<$  de -1.5 veces con fondo azul. Los valores negativos se presentan siempre con el color de fuente en azul.

**4.4.2.3. Progresión del ciclo celular en los modelos de ERE, EO y ERE+EO en la línea celular SKNMC.**

De las funciones biológicas reprimidas habíamos obtenido evidencias de que en los modelos de EO, ERE y ERE+EO, se daban variaciones en los niveles de expresión de numerosos genes implicados en el control del ciclo celular y en la mitosis, por lo que parecía que podría haber una alteración del ciclo celular de las células del neuroblastoma SKNMC tras los tratamientos. Con el fin de estudiar este efecto, analizamos por citometría de flujo el ciclo celular de los modelos celulares de ERE, EO y ERE+EO, tras 36h horas de tratamiento, como se muestra en la fig.R.36.

Al analizar los resultados (tabla R.25) de la expresión de los genes del ciclo celular, observamos que podría existir una parada de ciclo por inhibición de las ciclinas. La distribución de las células en el ciclo celular también revela una posible parada o acumulación en G0/G1 de las células tratadas con ERE. En el caso de EO, se observa un incremento de las células en fase S.

Con todo ello podríamos especular que en el neuroblastoma SKNMC el EO desencadenaría un incremento de las células en la fase S y que, en la coexistencia de ERE y EO, este efecto se revierte, produciéndose un incremento de la muerte celular.



**Fig.R.35. Efecto de los modelos de ERE, EO y ERE+EO sobre la progresión del ciclo celular analizado por citometría de flujo.** Las células SKNMC son cultivadas durante 36 horas en presencia o ausencia de cada uno de los tratamientos, tras lo que son marcadas con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo como se indica en Materiales y Métodos. En la figura se muestra el efecto de cada uno de los modelos, ERE, EO y ERE+EO, sobre la progresión del ciclo celular. En el panel A) se muestra la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular: subG1, G0/G1, S, G2/M. Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos independientes. En el panel B) se muestran los histogramas de la distribución celular a lo largo del ciclo correspondiente a un experimento representativo. Los histogramas muestran el contenido relativo de DNA, en el eje de abscisas, frente al número relativo de células, en el eje de las ordenadas, detectado por la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio al incorporarse al DNA a las 36 horas de la estimulación. Se indica para cada histograma el porcentaje de células en cada fase del ciclo.

Proteína	Gen	EO	ERE	EO + ERE
Cdk1	CDK2	-2.98	-13.01	-15.16
Cyclin A1	CCNA1	-2.47	-10.43	-42.87
Cyclin A2	CCNA2	-2.48	-7.42	-6.69
Cyclin B1	CCNB1	-5.49	-15.49	-17.01
Cyclin B2	CCNB2	-2.64	-2.46	-1.63
Cyclin B3	CCNB3	-9.19	-11.25	-2.35
Cdk2	CDK2	-2.39	-5.34	-7.67
Cyclin E1	CCNE1	1.32	-2.38	-4.78
Cyclin E2	CCNE2	2.10	-6.19	-13.67
Cdk4	CDK4	1.29	-1.33	1.65
Cdk6	CDK6	-7.86	6.86	1.81
Cyclin D1	CCND1	-2.97	-7.17	-16.31
		-2.20	-5.39	-11.36
Cyclin D2	CCND2	-1.12	-1.11	-1.43
Cyclin D3	CCND3	-1.57	4.15	2.01

**Tabla R.25. Cambio en la expresión génica del ciclo celular analizado por Microarray de cDNA.** Se indican las veces que cambia la expresión del gen en los modelos de EO, ERE y ERE+EO durante 18h de tratamiento, respecto a la expresión del cultivo control. Todos los valores presentan un  $p < 0.05$ , los que tienen un p mayor o no se expresan aparecen representados con un guión (-). Los genes con una expresión  $>$  de 1.5 veces aparecen con fondo rojo y los  $<$  de -1.5 veces con fondo azul. Los valores negativos se presentan siempre con el color de fuente en azul.



## V. Discusión

---





## 5.1. MODELO NEURONAL DE CONVERGENCIA DE ERE Y EO.

El retículo endoplásmico (RE) es un compartimento subcelular que juega un papel principal en funciones celulares centrales, que incluyen señalización y almacenamiento de calcio. Además, las proteínas nuevamente sintetizadas y secretadas en la membrana son plegadas y procesadas en el RE, reacciones que son estrictamente dependientes de calcio (Adams y Cory, 1998). El papel que juega el RE en el proceso de muerte neuronal cada vez tiene más relevancia (Xu y cols., 2005). Las condiciones asociadas con alteraciones de la homeostasis del calcio del RE o el bloqueo de las reacciones de procesamiento y plegamiento de las proteínas residentes en él, llevan a una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del mismo (Kaufman, 2004). Las células reaccionan a estas condiciones patológicas con una respuesta a estrés altamente conservada: la UPR (Schroder y Kaufman, 2005a).

Se sabe que mutaciones en la PS1 asociadas a la EA familiar sensibilizan la UPR (Katayama y cols., 2001); las presenilinas son proteínas localizadas en la membrana del RE y están implicadas en el procesamiento de la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide. Las mutaciones en la PS1 producen en neuronas sobrecarga del calcio y muerte celular bajo condiciones de estrés metabólico y oxidativo (Guo y cols., 1999; Schneider y cols., 2001).

El estrés oxidativo (EO) ha sido citado como un evento muy proximal a la EA (Eckert y cols., 2003; Zhu y cols., 2003); se piensa que el EO contribuye al daño neuronal en estados patológicos agudos del cerebro tales como isquemia transitoria, trauma y en varias enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central, incluida la enfermedad de Alzheimer (Andersen, 2004; Moreira y cols., 2004; Nunomura y cols., 2006). Se ha demostrado que varias funciones de membrana en diferentes compartimentos subcelulares son afectadas por agentes causantes de daño oxidativo. Alteraciones en la homeostasis del hierro y el cobre parecen implicadas en la EA cuando consideramos evidencias substanciales de incrementos en el daño oxidativo a lípidos, azúcares, proteínas y ácidos nucleicos, y también, a las proteínas de los ovillos neurofibrilares y de las placas seniles (Nunomura y cols., 1999; Sayre y cols., 1997; Smith y Perry, 1994; Smith y cols., 1997; Smith y cols., 1998; Takeda y cols., 2000).

Nuestros datos indican que el ERE (Tm, Tg) y el EO (X-XOD) inducen en las células SKNMC la expresión de las chaperonas del RE, Grps (Grp 78 y Grp 94), la pérdida de la viabilidad celular y la liberación de ROS. Recientes estudios revelan la importancia de Grp 78 y Grp94 como proteínas anti-apoptóticas y sugieren la relación entre ERE, UPR y muerte celular programada (Rao y cols., 2002; Reddy y cols., 1999).

El calcio es un segundo mensajero ubicuo y un regulador de la actividad celular (Ghosh y Greenberg, 1995; Mattson y cols., 2000; Matzno y cols., 2006). Con el fin de determinar si la liberación de calcio estaba implicada, examinamos los efectos de cada tratamiento de estrés sobre los niveles de calcio citosólico en las células SKNMC. Nuestros resultados muestran el incremento del calcio citosólico en respuesta a Tm y al sistema X-XOD; así como una reversión de la respuesta, en mayor o menor medida dependiendo del tratamiento, cuando bloqueamos los receptores de rianodina (RyR) del RE. Ambos inductores de estrés, en células acinares pancreáticas de ratón y en células endoteliales de aorta bovina, también llevan al incremento de la liberación y flujo del calcio a través de la membrana plasmática (Buckley y Whorton, 1997; Gonzalez y cols., 2002). Además, sugerimos que el calcio producido por Tm depende casi totalmente del RE, ya que si bloqueamos los RyRs la señal de estrés y la bajada de viabilidad se revierten. En el caso del sistema X-XOD, sólo una pequeña parte de la señal del calcio depende del RE, ya que si bien la señal de estrés si se revierte al bloquear dichos receptores del RE, no ocurre lo mismo con la bajada en la viabilidad celular.

Mientras que los efectos causales de las enfermedades neurodegenerativas están siendo estudiados, está claro que alteraciones en el plegamiento de proteínas y en la homeostasis redox se

implican en estas enfermedades (Forman y cols., 2003). Resultados muy consistentes en modelos animales y en autopsias de humanos revelan la acumulación de agregados de proteínas con modificaciones oxidativas en el DNA, lípidos y proteínas (Paschen, 2003). Además, modelos de EP, EA y algunas leucodistrofias exhiben activación de la UPR (Paschen, 2003) y EO (Andersen, 2004).

Entonces, se hacen necesarios los estudios en modelos celulares de ERE bajo EO que simulen la situación de los cerebros de EA. Recientemente, se ha descrito que la expresión de la mutación “Swedish” del APP en células PC12 las hace más vulnerables a la inducción de muerte celular después de la exposición a EO (Marques y cols., 2003). Nosotros hemos caracterizado un modelo celular en el que un estrés específico de RE producido por la exposición de las células a Tm coexiste con un EO producido por el sistema xantina/ xantina oxidasa. Con el fin de estudiar la respuesta celular, medimos dos marcadores específicos de ERE, Grp 78 y Grp 94, así como la viabilidad celular, los niveles de calcio citosólico y la producción de ROS.

El ERE combinado con el EO induce una mayor expresión de Grp 78 y Grp 94, y un mayor daño celular que cada tratamiento de estrés por separado. Además encontramos un incremento del calcio citosólico y un aumento de la producción de ROS con la coexistencia de los dos tipos de estrés.

La habilidad de las células para detoxificar las ROS es crucial para su homeostasis y supervivencia (Pappolla y cols., 1992; Zemlan y cols., 1989). Además, la producción de radicales libres se relaciona con el desarrollo del cáncer, la progresión de enfermedades degenerativas y procesos de envejecimiento (Hayes y McLellan, 1999). La interacción entre la formación de las especies reactivas de oxígeno, elevación de los niveles de calcio intracelular y la disfunción mitocondrial es investigada en patologías cerebrales, para estados de neurodegeneración agudos y crónicos (Chinopoulos y Adam-Vizi, 2006). Sin embargo, la secuencia de estos eventos previos a la muerte celular no está aún establecida.

La homeostasis del calcio del RE parece el mecanismo responsable de la integración y del procesamiento de la señal dentro del RE. En condiciones fisiológicas, las fluctuaciones de la concentración de calcio intracelular libre ligan la actividad celular con síntesis de proteínas y modificación post-traducciona. Alteraciones en la homeostasis del calcio del RE dirigen la respuesta de ERE, lo que al final puede resultar en neurodegeneración, y determinar la supervivencia o muerte de las células neuronales (Verkhatsky y Toescu, 2003).

La implicación del calcio en el modelo celular de ERE+EO está muy clara, puesto que hay un incremento significativo en la liberación del calcio con respecto a los modelos individuales, pero que orgánulos subcelulares lo producen no está tan claro. Parece que el RE juega un papel muy importante en la liberación del calcio en condiciones de ERE por tratamiento con Tm, ya que si bloqueamos este orgánulo, se revierte totalmente la señal de calcio y el potencial de membrana mitocondrial no sufre ninguna variación. En el EO, por tratamiento con el sistema X-XOD, sólo una pequeña parte de la señal del calcio depende del RE, ya que aunque se bloquee el RE se produce una señal de despolarización de la membrana mitocondrial que coincide con el incremento del calcio citosólico. Además hemos demostrado que dicha señal depende de una reentrada del calcio extracelular, puesto que al tratar las células en medio libre de calcio, el incremento del calcio citosólico producido por el EO en su mayoría se revierte. Se podría especular que el EO daña a la mitocondria, y que esta por despolarización de su membrana y apertura de poros manda una señal a la membrana plasmática de apertura de canales de calcio.

Con ERE en presencia de EO, la señal de calcio depende en parte de la reentrada de calcio del medio extracelular y, en parte, del RE, ya que no hay cambios en el potencial de membrana

mitocondrial hasta que bloqueamos el RE, momento en el que entraría en juego la mitocondria. Una línea de evidencias recientes sugiere que la conexión RE-mitocondria podría jugar un papel importante en la inducción de la muerte celular (Szabadkai y Rizzuto, 2004).

## **5.2. RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS (RIE) EN EL MODELO CELULAR DE ERE+EO.**

Las células eucariotas responden al mal plegamiento de proteínas en el RE, a la privación de aminoácidos o a los oxidantes por fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la traducción 2 (eIF2 $\alpha$ ). La ruta de señalización que lleva a la fosforilación de eIF2 $\alpha$  es iniciada por la fosforilación de PERK, (Harding y cols., 2003). Esta adaptación inhibe la síntesis general de proteínas (Dever, 2002), mientras promueve la traducción y expresión del factor de transcripción ATF4.

Nuestros resultados demuestran que existe un incremento mayor en el mRNA de PERK en ERE+EO (al comparar con ERE sólo). Aunque la activación de PERK depende de su dimerización y autofosforilación, en nuestros modelos dicho aspecto lo hemos demostrado indirectamente con la medida de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , puesto que hemos detectado la fosforilación de esta proteína en ERE+EO a tiempos más tempranos (3h) que en los modelos individuales.

En respuesta al estrés originado dentro del RE, las quinasas PERK e IRE1 $\alpha$ , junto con el factor de transcripción ATF6, inician la UPR, un programa de regulación transcripcional y traduccional, así como la ruta ERAD que regula la degradación de proteínas en condiciones de ERE (Back y cols., 2005). La importancia de una regulación estricta de la síntesis y modificación de proteínas dentro del RE es evidente cuando uno considera los innumerables estados patológicos que pueden ser atribuidos al mal funcionamiento de la ruta de respuesta a ERE. El mal plegamiento de proteínas específicas lleva directamente a enfermedades tales como fibrosis quística (Lukacs y cols., 1994), hipercolesterolemia (Tolleshaug y cols., 1983) y una gran variedad de desórdenes neurológicos (Paschen, 2003).

Nuestros resultados demuestran un aumento en el mRNA de IRE1 $\alpha$  y de ATF6 en los tres modelos celulares (aunque en EO sólo a partir de las 24h), demostrándose además que en la coexistencia de estreses (ERE+EO) se incrementa esta respuesta. Podemos afirmar entonces que en EO, ERE y ERE+EO están activadas todas las vías de UPR, aunque en EO esta activación se produce a tiempos tardíos.

### **a) Supervivencia celular.**

En condiciones de estrés transitorio, los niveles de las proteínas encargadas de normalizar la situación no pueden superar unos límites. Para mantener un estado homeostático se van a poner en marcha una serie de puntos de control que aseguran que las células estén bien equipadas para hacer frente a esta situación sin llegar a desencadenar el proceso irreversible de muerte celular (Back y cols., 2005).

#### Atenuación traduccional

Para limitar la acumulación de proteínas, PERK induce ATF4 que atenúa la traducción de proteínas y, a la vez, activa a un inhibidor de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , GADD34, como una vía de autorregulación. Células Atf4<sup>-/-</sup> tienen dañada la expresión de genes implicados en la importación de aminoácidos, en la biosíntesis de glutatión y en la resistencia a EO (Harding y cols., 2003). Células

Perk<sup>-/-</sup>, poseen una deficiente activación “upstream” de la quinasa eIF2 $\alpha$  que activa Atf4, acumulando peróxido endógeno durante el ERE (Harding y cols., 2000; Harding y cols., 2003).

Hemos demostrado que en la coexistencia de estreses la expresión de ATF4 se incrementa a partir de las 12h de tratamiento, coincidiendo con el punto de máxima fosforilación de eIF2 $\alpha$ , además, GADD34 tiene un pico de máxima transcripción a las 18h de tratamiento, punto en el que desaparece la fosforilación de eIF2 $\alpha$  para ERE+EO. Sin embargo, en EO, el mRNA de ATF4 se incrementa más tarde, con un máximo de expresión a las 36h de tratamiento, mientras que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  se da a las 12h. Podría ocurrir que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  está siendo utilizada para bloquear la biosíntesis de proteínas e intentar así revertir el EO.

En el ERE, no detectamos fosforilación temprana de eIF2 $\alpha$ , aunque sí se produce un incremento en la transcripción de ATF4 y GADD34 a las 12h de tratamiento. Esto podría ser, porque el nivel de fosforilación sea tan bajo que, en el inmunomarcado después de electroforesis, el anticuerpo no lo detecta, o bien, ATF4 pudiera ser activado por otras vías independientes de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , dato este que abriría un nuevo campo de estudio.

### Activación transcripcional

La capacidad del RE está totalmente controlada por una serie de moléculas residentes en él que son inducidas a nivel transcripcional en el proceso de la UPR. Ire1 $\alpha$  es requerida para el procesamiento de XBP1, cuyo fragmento es un potente activador transcripcional inductor de una amplia variedad de genes diana de UPR, incluyendo las chaperonas residentes en el RE (Lee y cols., 2003; Yoshida y cols., 2001). La delección de IRE1 $\alpha$  produce mortalidad embrionaria (Urano y cols., 2000a), un hallazgo que sugiere un papel de la UPR en desarrollo de mamíferos. En línea con dichos resultados, se ha descrito que un ratón transgénico portador de un gen reportero de UPR muestra actividad diferencial a lo largo de todo el desarrollo embrionario (Iwawaki y cols., 2004). Mientras que los animales deficientes en XBP1 mueren durante la gestación (Reimold y cols., 2000), XBP1 en heterozigosis crece normalmente, pero desarrolla resistencia a insulina, factor central de riesgo para la aparición de la diabetes tipo II [Ozcan y cols., 2004]. Fibroblastos deficientes en IRE1 $\alpha$  son capaces de regular positivamente algunos de los genes diana de UPR, incluyendo Bip y XBP1 (Wang y cols., 1998a). Esto es posible gracias al factor de transcripción ATF6, que es capaz de ligarse al promotor de estas dianas de UPR (Haze y cols., 1999; Li y cols., 2000) activando así su transcripción.

Células deficientes en XBP1 y ATF6 $\alpha$  son significativamente defectuosas en inducción de los genes diana de UPR, sugiriendo que, al menos parcialmente, existe una redundancia en la función de estos factores de transcripción bZIP (Lee y cols., 2003). Curiosamente, la ruta ATF6 es activada antes que la de XBP1, así se crea una escala en el tiempo, de forma que ATF6 media una respuesta que remedia la situación de estrés en el RE solamente a través de la inducción de las chaperonas. En la situación de un estrés prolongado, la ruta XBP1 promueve entonces la inducción en las chaperonas y también regula positivamente la capacidad de ERAD (Schroder y Kaufman, 2005a; Yoshida, 2003).

Nuestros resultados demuestran que tanto en ERE como en la coexistencia de ERE y EO, las vías de supervivencia, que incluyen la transcripción de las chaperonas, están activadas desde las 6h de tratamiento, presentando siempre un máximo de expresión entre 18 y 24h; dicha sobreexpresión es mantenida en ERE y con una tendencia a la bajada a partir de las 36h en ERE+EO.

### Degradación asociada al RE (ERAD)

Cuando las proteínas no alcanzan su conformación nativa o hay una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE son eliminadas por una vía de degradación asociada al RE (ERAD) que tiene que estar perfectamente coordinada con la UPR (Casagrande y cols., 2000; Friedlander y cols., 2000; Travers y cols., 2000). Analizamos la expresión de EDEM y encontramos que se activa a tiempos tempranos tanto en ERE como en ERE+EO, pero todavía más tempranamente en la combinación de

estreses. Parece que, en nuestros modelos celulares, en respuesta a una señal de estrés que afecta al RE, una de las rutas más tempranamente inducidas podría ser la de ERAD.

Si analizamos en general todos los resultados de la activación de la vía de supervivencia en respuesta a los diferentes tipos de estrés, podríamos concluir que tanto en ERE como en ERE+EO se encuentran activadas todas las vías del RE que intentan solucionar el problema de acumulación de proteínas, además dicha activación está incrementada en ERE+EO en comparación con ERE. En lo que refiere al EO, sólo se encuentran activada y a las 36h GADD34, ATF6 e IRE1 $\alpha$ ; se podría especular y decir que el EO activa la vía UPR, pero a tiempos tardíos.

## **b) Muerte celular: apoptosis.**

En el caso de una señalización de estrés suprafisiológica, los cambios celulares son más severos, y la muerte celular programada puede ser la mejor opción para el organismo. En respuesta a un ERE prolongado o crónico, las células disparan la muerte celular programada y, aunque la señalización de CHOP y la producción de ROS contribuyen a este proceso, también existe una ruta de señalización especializada dependiente de caspasas que es activada durante la UPR (Hitomi y cols., 2004; Nakagawa y Yuan, 2000).

El incremento en los niveles de calcio citosólico y el aumento en la producción de ROS, producida por el ERE en presencia de EO, podrían indicar un incremento en la activación de la muerte celular. Con el fin de demostrar esto, analizamos la apoptosis específica de ERE (expresión de CHOP/GADD153), la disfunción mitocondrial y la apoptosis dependiente de caspasas. El análisis de la expresión de CHOP en nuestro modelo celular revela que la combinación de ERE con EO lleva a un incremento significativo de la expresión de CHOP al comparar con la producida por ERE. La sobreexpresión de CHOP promueve arresto del ciclo celular y apoptosis (Friedman, 1996), mientras que la deficiencia en CHOP podría proteger a las células de la apoptosis inducida por ERE (Zinszner y cols., 1998). Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que el ERE en presencia de EO regula positivamente la muerte celular activada por ERE.

En lo que respecta a la disfunción mitocondrial la medida más alta y más significativa de citocromo c en la fracción citosólica fue detectada con ERE en presencia de EO. En el ERE no fue detectada una liberación de citocromo c significativa. Nuestros resultados demuestran que la Tm dirige una cascada apoptótica independiente de citocromo c, en línea con otros estudios publicados (Morishima y cols., 2002).

Los estudios en cursos temporales de activación de caspasa 3 y degradación de PARP revelaron que X-XOD y Tm individualmente, o en combinación simultánea, generan una señal apoptótica de forma dependiente de caspasas. Además, estos resultados revelaron un incremento en la activación de la muerte celular dependiente de caspasas con la combinación de ambos tratamientos de estrés. Finalmente, la cuantificación de la apoptosis confirmó el incremento en la muerte apoptótica en nuestro modelo celular.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la coexistencia de ERE y EO llevan a un incremento en la activación de la muerte apoptótica. Los resultados obtenidos en este modelo celular sugieren que el ERE y la gradual liberación de EO por la edad podría llevar a un incremento en la vulnerabilidad a apoptosis en neuronas de pacientes de EA. Nosotros proponemos este modelo que liga ERE y EO con apoptosis para el estudio de los mecanismos moleculares en la neurodegeneración asociada a EA.



### 5.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENICA DIFERENCIAL Y GENÓMICA FUNCIONAL DEL MODELO CELULAR DE NEURODEGENERACIÓN.

Hemos utilizado dos técnicas, Microarray de DNA y RT-PCR cuantitativa en array, para caracterizar el efecto de EO, ERE y ERE+EO sobre la expresión génica del neuroblastoma SKNMC. Utilizamos un inhibidor de la N-glicosilación de las proteínas (Tm) para producir el ERE, y el sistema X-XOD, que libera aniones superóxido, para producir el EO. El tiempo de incubación fijo fue de 18h, para todos los análisis de Microarray de cDNA. Nos planteamos conocer los genes que varían su expresión en estos modelos celulares de estrés para investigar las funciones celulares que están alteradas en la coexistencia de estreses.

Mediante la RT-PCR en array quisimos, por un lado, caracterizar los cambios en la expresión de los genes de mayor interés a lo largo del tiempo y, por otro, confirmar los resultados obtenidos en el Microarray. Obtuvimos una confirmación del 85% de la sobreexpresión de los genes estudiados con ambas técnicas, pero muy pocos de los reprimidos se nos confirmaron (55%) y, además, los valores de la sobreexpresión fueron menores para la RT-PCR que para el Microarray. Una posible explicación para estas diferencias es que las sondas usadas para cada aproximación metodológica corresponden a partes de la secuencia génica diferentes, pudiendo estar en alguna más favorecida la hibridación (Microarray) o la amplificación (RT-PCR); también es posible que las sondas hibriden o amplifiquen isoformas diferentes. Por otro lado, la hibridación es una técnica “semicuantitativa”, por lo que los resultados obtenidos por Microarray deben ser confirmados mediante la RT-PCR cuantitativa.

Cuando analizamos los coeficientes de correlación de los análisis de Microarrays (fig.R.34), encontramos que los resultados obtenidos por las dos plataformas, Affymetrix y Applied Biosystems, son perfectamente comparables; sin embargo, para los estudios funcionales los datos de Applied Biosystems son más fiables porque se realizaron sobre triplicados experimentales de cada modelo celular de estrés.

Observamos que, para los Microarrays, hay más genes que cambian su expresión en el modelo de ERE+EO, en relación a los modelos individuales. Esto corrobora la idea que se ha ido revelando durante el desarrollo de esta Tesis, que el ERE en presencia de EO produce una señal sinérgica, es decir, la señal producida por ERE+EO es mayor que la suma de las dos señales individuales de ERE y EO. Así pues, estos resultados favorecen la hipótesis que establecíamos al principio de este trabajo, y dan mayor consistencia a la importancia del estudio de este modelo celular en relación con la neurodegeneración.

Hemos observado que, **en el modelo de EO**, es mayor el número de genes reprimidos que sobreexpresados, por lo que, a 18h de tratamiento, el EO parece relacionarse más con señales negativas, de represión, que con señales positivas de sobreexpresión.

La biosíntesis del colesterol y el metabolismo de lípidos y ácidos grasos parecen ser los procesos biológicos más alterados en EO. Dentro de estos procesos se encuentran tres de los genes más sobreexpresados: APOE, PLA2G3 y HMGCR, que se han seleccionado como genes de gran interés para estudios posteriores en el laboratorio.

La asociación entre colesterol y demencia ha ganado un creciente interés desde que hay estudios que sugieren que una dieta baja en lípidos puede disminuir el riesgo a EA (Wolozin, 2004). Animales (conejos) a los que se le pone una dieta rica en colesterol desarrollan con el tiempo una alta intensidad de almacenamiento de A $\beta$  intracelular en la región del hipocampo comparados con animales control (Sparks y cols., 1994). Además, se ha descrito que una dieta rica en colesterol afecta a los ratones transgénicos de APP e incrementa las deposiciones de A $\beta$  en el cerebro (Refolo y cols.,

2000). Estos mismos ratones al tratarlos con un inhibidor de la síntesis del colesterol (BM15.766) redujeron los depósitos amiloides en el cerebro (Refolo y cols., 2001). En otros estudios, cultivos primarios de neuronas tratados con estatinas dieron como resultado una reducción en la formación del A $\beta$  total (Simons y cols., 1998), especialmente la isoforma A $\beta$ 42 (Frears y cols., 1999). Parece probable que sea la inhibición “in situ” de la producción de colesterol per sé lo que lleve a una reducción en la producción de A $\beta$  y A $\beta$ 42 y, consecuentemente, una reducción en la formación de placas amiloides en los modelos utilizados para investigar la EA (Sjogren y Blennow, 2005).

Al realizar un estudio de asociación génica (pacientes de EA y controles) con diferentes polimorfismos de la sPLA2 isoforma GIII, uno de los genes más sobreexpresados en EO, se ha encontrado una asociación clara en la muestra general para el SNP 29. Las sPLA2 no sólo están implicadas en transducción de señales sino que su actividad está también alterada en trauma cerebral y en enfermedades neurodegenerativas asociadas con inflamación y EO, así como en algunos tumores cerebrales (Farooqui y cols., 1999). La sPLA2 induce apoptosis en neuronas corticales, y la muerte puede reducirse significativamente con inhibidores de estas fosfolipasas secretadas (Yagami y cols., 2002; Zhao y cols., 2002). Diversas evidencias sugieren que todas las isoformas de sPLA2 están implicadas en apoptosis y que los niveles de ácido araquidónico libre podrían ser una señal crítica de esta apoptosis (Farooqui y cols., 2004).

Las funciones biológicas más alteradas **en el modelo de ERE** son el plegamiento de proteínas, el tráfico intracelular de proteínas, la reacción de la proteína disulfuro isomerasa, la glicosilación, modificación y metabolismo de proteínas y la respuesta a estrés; todas ellas son funciones implicadas en la síntesis “de novo” y procesamiento de las proteínas. Dentro de estas funciones destacan una serie de genes sobreexpresados: Grp94/TRA1, Grp78/Bip/HSPA5, Orp150/HYOU1, DNAJB9, PERK/EIF2AK3 y GADD153/CHOP. Estos seis genes han sido seleccionados para estudios de asociación genética en nuestro laboratorio. También se encontró por estudios de asociación génica (en pacientes de EA y controles) una asociación muy significativa del SNP de CHOP para mayores de 85 años.

Además, en este modelo celular, hemos seleccionado de los genes más sobreexpresados, un gen que codifica para una proteína desconocida (MGC11256). Estudios de asociación génica (en pacientes de EA y controles) de algunos polimorfismos de este gen dan como resultado una tendencia a la asociación de la muestra general para el SNP MGC-c. Por todo esto, MGC11256 sería una proteína candidata a estudios funcionales, en concreto en la implicación de la vía de ERE en la neurodegeneración.

Hay que destacar, **en el modelo de convergencia de ERE y EO**, las rutas más sobreexpresadas y que no aparecen como tal en ninguno de los modelos individuales: la ruta de señalización del receptor nicotínico de la acetilcolina, la respuesta a EO y la ruta de señalización de la apoptosis.

Los otros procesos biológicos más sobreexpresados en ERE+EO coinciden en su mayoría con el ERE, estando sobre todo alteradas las funciones relacionadas con el RE. También destaca la sobreexpresión, al igual que en EO, del metabolismo de lípidos, ácidos grasos y esteroides; pero no ocurre lo mismo con la biosíntesis del colesterol. En general, la sobreexpresión génica en el modelo de coexistencia de estreses es más coincidente con el modelo de ERE que con el de EO, aunque, como ya puntualizamos anteriormente, en el modelo de coexistencia de estreses los valores de sobreexpresión están incrementados significativamente con respecto a los modelos individuales.

Como procesos biológicos más reprimidos en los tres modelos celulares, hay que destacar el ciclo celular y la mitosis.

Los análisis a nivel de expresión génica revelan que el EO, en cierta manera, aumentaría las señales que activan el ERE. Esto estaría de acuerdo con recientes trabajos realizados en relación con la EA familiar que sugieren que mutaciones en APP sensibilizan las neuronas a la apoptosis

inducida por EO (Marques y cols., 2003).

#### 5.4. ANÁLISIS GENÓMICO DE LA RESPUESTA INTEGRADA A ESTRÉS.

Puesto que la respuesta a estrés del RE era una de las funciones más sobreexpresadas en el modelo celular de ERE+EO, realizamos el estudio de todos los genes implicados en dicha respuesta y que se habían analizado por el Microarray de cDNA (Applied Biosystems).

##### *La respuesta a mal plegamiento de proteínas (UPR).*

IRE1 $\alpha$  está sobreexpresada en ERE y ERE+EO (y más del doble en ERE+EO), sugiriendo que la ruta de supervivencia XBP1 es la que van a seguir ERE y ERE+EO. La vía de TRAF2 que señala a apoptosis vía de fosforilación de c-jun (Nishitoh y cols., 2002; Nishitoh y cols., 1998; Urano y cols., 2000b) estaría reprimida tanto en ERE como en EO.

Al analizar la ruta de PERK, los datos nos revelan que este gen está sobreexpresado en los tres modelos celulares. Además se sobreexpresan en ERE y en ERE+EO ATF4 y todos sus genes diana, incluido CHOP (Gotoh y cols., 2002; Harding y cols., 2000; Ron, 2002); la sobreexpresión de este último gen está indicando un inicio de la apoptosis en dichos modelos celulares. El gen de NRF2 no sufre modificaciones, aunque la activación de esta vía depende de la fosforilación de Nrf2 (Cullinan y Diehl, 2006).

En la ruta de ATF6, dicho gen sólo se sobreexpresa en ERE+EO, pero a este tiempo se encuentran sobreexpresados todos los genes diana en ERE y ERE+EO, excepto SREBP2, un gen implicado en lipogénesis, que sólo está sobreexpresado en EO.

Nuestros resultados no sólo confirman que todas las vías UPR se encuentran sobreexpresadas en ERE y ERE+EO, sino que además en la combinación de estreses la expresión de los genes de la vía UPR está incrementada en comparación con ERE solo.

##### *Receptores de calcio del RE.*

Como hemos demostrado con los resultados descritos ya, el calcio está muy implicado en la señalización de los diferentes tipos de estrés utilizados. El análisis en el Microarray de la expresión de los genes que codifican para los receptores del RE y sus ligandos, nos reveló que se encuentra sobreexpresado en los tres modelos uno de los genes de la bomba SERCA de reentrada de calcio del citosol al igual que el receptor de salida de calcio del RE InsP3R. Los receptores de rianodina (RyR) se sobreexpresaban en el EO. Podría ser que estos receptores se sobreexpresen a tiempos cortos para dar salida al calcio como respuesta inmediata a la señal de estrés.

##### *La respuesta a sobrecarga en el RE (EOR).*

Incrementos en el calcio intracelular, bien por la salida de calcio del RE, bien por señalización mitocondrial y reentrada de calcio del medio extracelular, van a disparar una serie de respuestas, entre las que se encuentran la activación de ROS y calpainas, que llevarían a la activación de NF $\kappa$ B y a la expresión de genes de la respuesta inflamatoria (Pahl, 1999). Toda la respuesta iniciada por la liberación de ROS puede ser anulada por antioxidantes, como son SOD o la HMOX1 (Gong y cols., 2001), que en nuestros modelos celulares se encuentran diferencialmente expresadas, ya que la primera está inhibida y la segunda sobreexpresada.

Recientemente se ha sugerido una interferencia entre STATs y la ruta de NF $\kappa$ B, identificándose la JAK2 como esencial en este proceso en ciertos tipos de células (Siebenlist, 2001). La enzima JAK2 se activa por autofosforilación y, entonces, fosforila al receptor que recluta a las STATs. Esta

interferencia podría afectar a la bien caracterizada activación de I $\kappa$ B, como la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en los residuos de tirosina (Waris, Tardif y Suddiqui, 2002). Las quinasas JAKs están diferencialmente expresadas en nuestros modelos celulares, siendo la JAK2 la única que está sobreexpresada en los tres tipos de estrés.

En cuanto a las calpainas, la mayoría se encuentran sin cambios aunque sería interesante el estudio de las que sí varía su expresión.

#### *Apoptosis mitocondrial.*

La mayoría de los genes implicados en la apoptosis mitocondrial aparecen sin cambios, aunque si aparece sobreexpresada en los tres modelos celulares una isoforma de AIF, proteína que regula una ruta apoptótica independiente de caspasas. Los genes de la familia de BCL2 no muestran cambios muy destacados, tanto los pro- como los anti-apoptóticos. Hay que tener en cuenta que el tiempo de incubación de los tratamientos de estrés es 18h para todos los análisis de los Microarrays de DNA. Y, que a las 18h están sobreexpresadas todas las vías de supervivencia, por lo que sólo presentarán cambios de expresión los genes que inicien las vías apoptóticas. Como ya habíamos demostrado anteriormente la apoptosis en nuestros modelos se inicia a las 24h de tratamiento.

#### *Arresto del ciclo celular.*

Como ya hemos visto, PERK produce una inhibición en de la ciclina D1 que puede llevar al arresto del ciclo celular. La ciclina D1 (ciclina reguladora de G1) es una diana directa del bloqueo traduccional dependiente de UPR (Brewer y cols., 1999). La inhibición de la traducción dependiente de eIF2 $\alpha$  lleva a una rápida disminución en la cantidad de ciclina celular D1 y, consecuentemente, al arresto del ciclo celular en G1. La inducción del arresto del ciclo celular acoplado a la larga reducción en la traducción de las proteínas provee a la célula de un período de recuperación en condiciones de estrés, ya que la traducción de proteínas es el proceso celular con mayor demanda energética.

Si analizamos la expresión de los genes de los puntos de control del ciclo celular en los tres modelos celulares, vemos que la mayoría se encuentran reprimidos, por lo que podríamos hablar de una parada del ciclo. El análisis por citometría de flujo de ciclo celular a las 36h nos reveló una parada en el ciclo en G0/G1 para ERE y ERE+EO. En el EO, la acumulación de células en la fase S nos podría indicar una parada en este punto del ciclo celular.

### **5.5. MODELO DE CONVERGENCIA DE ERE Y EO PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA NEURODEGENERACION.**

Una característica común de muchas enfermedades neurodegenerativas es la acumulación de proteínas mal plegadas que afectan a varios sistemas de señalización celular, también a la conectividad neuronal y a la activación de la muerte celular (Forman, Lee y Trojanowski, 2003). Nosotros proponemos que estos procesos podrían ser agravados por estrés oxidativo; es decir, la enfermedad podría ocurrir cuando las células fallan para responder de manera adaptativa al incremento en estrés oxidativo relacionado con la edad, no resolviéndose la acumulación de proteínas y produciéndose una disfunción de la respuesta a estrés de ER. Además, bajo este fondo de “alerta” relacionado con la edad, factores genéticos y ambientales determinarían si la enfermedad se desarrolla; estos factores incluyen a mutaciones causales, factores de riesgo genético, y factores ambientales como la dieta (Mattson y Magnus, 2006).

Por todo ello, sugerimos un modelo celular de convergencia de ERE y EO para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que determinan si el sistema nervioso se adapta positivamente o por el contrario desarrolla enfermedad durante el envejecimiento.

Esta tesis abre muchas incógnitas sobre los mecanismos y los genes implicados directamente en este proceso, pero nos brinda una base para seguir investigando en la neurodegeneración, tanto en modelos animales como celulares.

## VI. Conclusiones

---





El trabajo experimental realizado en esta tesis ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. Hemos desarrollado un modelo celular en el que convergen estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidativo en la línea de neuroblastoma humano SKNMC. En este modelo, hemos demostrado que la combinación simultánea de estos estreses produce un aumento en la inducción de la expresión de Grps y en la pérdida de viabilidad neuronal, así como un incremento en la producción de ROS y en los niveles de calcio citosólico, en comparación con los modelos simples de ERE y EO.
2. El estrés de retículo endoplásmico en presencia de estrés oxidativo aumenta la respuesta integrada a estrés, tanto la vía de supervivencia como la de muerte celular. El estrés de retículo endoplásmico y la convergencia activan todas las vías del RE que tratan de solucionar el problema de acumulación de proteínas, pero dicha activación está incrementada en la convergencia de estreses respecto al estrés de retículo endoplásmico. En el tratamiento con estrés oxidativo sólo se activa la vía UPR a tiempos tardíos.
3. La coexistencia de estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidativo produce un incremento en la muerte apoptótica determinada por el aumento de expresión en CHOP, por el incremento en la liberación de citocromo c, por la activación de caspasa 3 y por la degradación de PARP.
4. El análisis de expresión génica diferencial revela que hay más genes que cambian su expresión en el modelo de ERE+EO con respecto a los modelos individuales; y que, en general, la sobreexpresión génica en el modelo de coexistencia de estreses es más coincidente con el modelo de ERE que con el de EO, aunque los valores de sobreexpresión están incrementados significativamente con respecto a los modelos simples. La fosfolipasa 2 grupo III (PLA2GIII) y una proteína desconocida (MGC11256) están entre los genes más sobreexpresados en estrés oxidativo y en estrés de retículo endoplásmico, respectivamente.
5. El análisis genómico funcional ha demostrado que, en el estrés oxidativo, el proceso biológico más alterado es el metabolismo del colesterol; en el ERE, la vía más alterada es la respuesta a estrés y la UPR; y en la coexistencia de estrés de retículo y estrés oxidativo están sobreexpresadas la ruta de señalización del receptor nicotínico de la acetilcolina, la respuesta a estrés oxidativo y la ruta de señalización de la apoptosis.

### Conclusión final:

El estrés de retículo endoplásmico en presencia de estrés oxidativo produce un incremento en la señalización de calcio y en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), dando lugar, a un incremento en la activación de la respuesta integrada a estrés y un aumento en la muerte celular por apoptosis. Los análisis de la expresión génica en el modelo celular de convergencia de estrés de retículo y estrés oxidativo demuestran que las rutas más alteradas coinciden en su mayoría con las que se alteran por ERE y no por EO; dichos análisis también indican que el EO incrementa las señales de respuesta al ERE. Así pues, los resultados obtenidos en este modelo celular sugieren que el ERE junto con la producción de EO asociada a la edad pueden llevar a una mayor vulnerabilidad de las neuronas a la respuesta a estrés y a la apoptosis. Este modelo de convergencia de estrés de retículo y estrés oxidativo permitiría el estudio de los mecanismos moleculares asociados a la neurodegeneración.

## VII. Referencias

---



- Abraham, E. 1997. NF-kappa B and reactive oxygen intermediates. *Shock*. 7:97.
- Adams, J.M., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281:1322-6.
- Alvarez-Gonzalez, R., H. Spring, M. Muller, and A. Burkle. 1999. Selective loss of poly(ADP-ribose) and the 85-kDa fragment of poly(ADP-ribose) polymerase in nucleoli during alkylolation-induced apoptosis of HeLa cells. *J Biol Chem*. 274:32122-6.
- Andersen, J.K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*. 10 Suppl:S18-25.
- Aoyama, K., K. Matsubara, Y. Fujikawa, Y. Nagahiro, K. Shimizu, N. Umegae, N. Hayase, H. Shiono, and S. Kobayashi. 2000. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*. 47:524-7.
- Arnoult, D., B. Gaume, M. Karbowski, J.C. Sharpe, F. Cecconi, and R.J. Youle. 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J*. 22:4385-99.
- Back, S.H., M. Schroder, K. Lee, K. Zhang, and R.J. Kaufman. 2005. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods*. 35:395-416.
- Bando, Y., T. Katayama, K. Kasai, M. Taniguchi, M. Tamatani, and M. Tohyama. 2003. GRP94 (94 kDa glucose-regulated protein) suppresses ischemic neuronal cell death against ischemia/reperfusion injury. *Eur J Neurosci*. 18:829-40.
- Barone, M.V., A. Crozat, A. Tabaee, L. Philipson, and D. Ron. 1994. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev*. 8:453-64.
- Beal, M.F., R.J. Ferrante, S.E. Browne, R.T. Matthews, N.W. Kowall, and R.H. Brown, Jr. 1997. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 42:644-54.
- Berridge, M.J., M.D. Bootman, and P. Lipp. 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature*. 395:645-8.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, L.M. Hendershot, H.P. Harding, and D. Ron. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2:326-32.
- Borchelt, D.R., T. Ratovitski, J. van Lare, M.K. Lee, V. Gonzales, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, D.L. Price, and S.S. Sisodia. 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*. 19:939-45.
- Bossy-Wetzel, E., R. Schwarzenbacher, and S.A. Lipton. 2004. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med*. 10 Suppl:S2-9.
- Boyce, M., K.F. Bryant, C. Jousse, K. Long, H.P. Harding, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D. Ma, D.M. Coen, D. Ron, and J. Yuan. 2005. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*. 307:935-9.
- Brewer, J.W., L.M. Hendershot, C.J. Sherr, and J.A. Diehl. 1999. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:8505-10.
- Bruckner, S.R., G. Perry, and S. Estus. 2003. 4-hydroxynonenal contributes to NGF withdrawal-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem*. 85:999-1005.
- Buckley, B.J., and A.R. Whorton. 1997. Tunicamycin increases intracellular calcium levels in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol*. 273:C1298-305.
- Butterfield, D.A., A. Castegna, C.M. Lauderback, and J. Drake. 2002. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain



- contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging*. 23:655-64.
- Calfon, M., H. Zeng, F. Urano, J.H. Till, S.R. Hubbard, H.P. Harding, S.G. Clark, and D. Ron. 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 415:92-6.
- Casagrande, R., P. Stern, M. Diehn, C. Shamu, M. Osario, M. Zuniga, P.O. Brown, and H. Ploegh. 2000. Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol Cell*. 5:729-35.
- Corder, E.H., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, and M.A. Pericak-Vance. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 261:921-3.
- Culmsee, C., and M.P. Mattson. 2005. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 331:761-77.
- Cullinan, S.B., and J.A. Diehl. 2006. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 38:317-32.
- Cutler, R.G., J. Kelly, K. Storie, W.A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J.C. Troncoso, and M.P. Mattson. 2004. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:2070-5.
- Cutler, R.G., W.A. Pedersen, S. Camandola, J.D. Rothstein, and M.P. Mattson. 2002. Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 52:448-57.
- Chan, S.L., M. Mayne, C.P. Holden, J.D. Geiger, and M.P. Mattson. 2000. Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem*. 275:18195-200.
- Chen, X., J. Shen, and R. Prywes. 2002. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem*. 277:13045-52.
- Chen, Z.J., L. Parent, and T. Maniatis. 1996. Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*. 84:853-62.
- Chinopoulos, C., and V. Adam-Vizi. 2006. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *Febs J*. 273:433-50.
- Dalton, T.P., H.G. Shertzer, and A. Puga. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39:67-101.
- Danial, N.N., and S.J. Korsmeyer. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116:205-19.
- Davies, K.J., C.D. Harris, and G. Ermak. 2001. The essential role of calcium in induction of the DSCR1 (ADAPT78) gene. *Biofactors*. 15:91-3.
- De Strooper, B., P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, and F. Van Leuven. 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 391:387-90.
- Deshmukh, M., C. Du, X. Wang, and E.M. Johnson, Jr. 2002. Exogenous smac induces competence and permits caspase activation in sympathetic neurons. *J Neurosci*. 22:8018-27.
- Dever, T.E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*. 108:545-56.
- Dexter, D.T., C.J. Carter, F.R. Wells, F. Javoy-Agid, Y. Agid, A. Lees, P. Jenner, and C.D. Marsden. 1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 52:381-9.
- Donze, O., J. Deng, J. Curran, R. Sladek, D. Picard, and N. Sonenberg. 2004. The protein kinase PKR: a molecular clock that sequentially activates survival and death programs. *Embo J*. 23:564-71.
- Dorner, A.J., L.C. Wasley, P. Raney, S. Haugejorden, M. Green, and R.J. Kaufman. 1990. The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide

- isomerase expression and secretion. *J Biol Chem.* 265:22029-34.
- Douthell, J., M. Treiman, U. Oschlies, and W. Paschen. 1999. Recovery of neuronal protein synthesis after irreversible inhibition of the endoplasmic reticulum calcium pump. *Cell Calcium.* 25:419-28.
- Dreher, D., and A.F. Junod. 1995. Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 162:147-53.
- Dykens, J.A. 1994. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$ : implications for neurodegeneration. *J Neurochem.* 63:584-91.
- Eckert, A., U. Keil, C.A. Marques, A. Bonert, C. Frey, K. Schussel, and W.E. Muller. 2003. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 66:1627-34.
- Farooqui, A.A., M.L. Litsky, T. Farooqui, and L.A. Horrocks. 1999. Inhibitors of intracellular phospholipase A2 activity: their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders. *Brain Res Bull.* 49:139-53.
- Farooqui, A.A., W.Y. Ong, and L.A. Horrocks. 2004. Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2. *Neurochem Res.* 29:1961-77.
- Faucheau, C., A. Diu, A.W. Chan, A.M. Blanchet, C. Miossec, F. Herve, V. Collard-Dutilleul, Y. Gu, R.A. Aldape, J.A. Lippke, and et al. 1995. A novel human protease similar to the interleukin-1 beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *Embo J.* 14:1914-22.
- Ferri, K.F., and G. Kroemer. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* 3:E255-63.
- Finkel, T., and N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408:239-47.
- Fischer, H., U. Koenig, L. Eckhart, and E. Tschachler. 2002. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:722-6.
- Forman, M.S., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski. 2003. 'Unfolding' pathways in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* 26:407-10.
- Frears, E.R., D.J. Stephens, C.E. Walters, H. Davies, and B.M. Austen. 1999. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport.* 10:1699-705.
- Friedlander, R., E. Jarosch, J. Urban, C. Volkwein, and T. Sommer. 2000. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2:379-84.
- Friedman, A.D. 1996. GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAT/enhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D c13 myeloid cells. *Cancer Res.* 56:3250-6.
- Gamaley, I.A., and I.V. Klyubin. 1999. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int Rev Cytol.* 188:203-55.
- Gething, M.J., and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature.* 355:33-45.
- Ghosh, A., and M.E. Greenberg. 1995. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science.* 268:239-47.
- Gibson, G.E., and H.M. Huang. 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 26:575-8.
- Gil, J., J. Alcamí, and M. Esteban. 1999. Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol Cell Biol.* 19:4653-63.
- Goate, A., M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A.

- Haynes, N. Irving, L. James, and et al. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 349:704-6.
- Gong, G., G. Waris, R. Tanveer, and A. Siddiqui. 2001. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:9599-604.
- Gonzalez, A., A. Schmid, G.M. Salido, P.J. Camello, and J.A. Pariente. 2002. XOD-catalyzed ROS generation mobilizes calcium from intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal*. 14:153-9.
- Good, P.F., A. Hsu, P. Werner, D.P. Perl, and C.W. Olanow. 1998. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 57:338-42.
- Gotoh, T., S. Oyadomari, K. Mori, and M. Mori. 2002. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. *J Biol Chem*. 277:12343-50.
- Guo, Q., L. Sebastian, B.L. Sopher, M.W. Miller, C.B. Ware, G.M. Martin, and M.P. Mattson. 1999. Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J Neurochem*. 72:1019-29.
- Gutteridge, J.M., and J. Mitchell. 1999. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull*. 55:49-75.
- Halliwell, B. 1999. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res*. 443:37-52.
- Han, A.P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S.H., and Chen, J.J. 2001. *EMBO J*. 20 (23): 6909-18.
- Han, H.J., H.J. Choi, and S.H. Park. 2000. High glucose inhibits glucose uptake in renal proximal tubule cells by oxidative stress and protein kinase C. *Kidney Int*. 57:918-26.
- Harding, H.P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, and D. Ron. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 6:1099-108.
- Harding, H.P., Y. Zhang, and D. Ron. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 397:271-4.
- Harding, H.P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P.D. Lu, M. Calton, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D.F. Stojdl, J.C. Bell, T. Hettmann, J.M. Leiden, and D. Ron. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *In Mol Cell*. Vol. 11. 619-33.
- Hatai, T., A. Matsuzawa, S. Inoshita, Y. Mochida, T. Kuroda, K. Sakamaki, K. Kuida, S. Yonehara, H. Ichijo, and K. Takeda. 2000. Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem*. 275:26576-81.
- Haughey, N.J., R.G. Cutler, A. Tamara, J.C. McArthur, D.L. Vargas, C.A. Pardo, J. Turchan, A. Nath, and M.P. Mattson. 2004. Perturbation of sphingolipid metabolism and ceramide production in HIV-dementia. *Ann Neurol*. 55:257-67.
- Hayes, J.D., and L.I. McLellan. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*. 31:273-300.
- Hayes, J.D., and R.C. Strange. 1995. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res*. 22:193-207.
- Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori. 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*. 10:3787-99.

- Hegde, R., S.M. Srinivasula, Z. Zhang, R. Wassell, R. Mukattash, L. Cilenti, G. DuBois, Y. Lazebnik, A.S. Zervos, T. Fernandes-Alnemri, and E.S. Alnemri. 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem.* 277:432-8.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407:770-6.
- Hensley, K., M.L. Maitt, Z. Yu, H. Sang, W.R. Markesbery, and R.A. Floyd. 1998. Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci.* 18:8126-32.
- High, S., F.J. Lecomte, S.J. Russell, B.M. Abell, and J.D. Oliver. 2000. Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett.* 476:38-41.
- Hinnebusch, B.J., R.D. Perry, and T.G. Schwan. 1996. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (hms) locus in the transmission of plague by fleas. *Science.* 273:367-70.
- Hitomi, J., T. Katayama, Y. Eguchi, T. Kudo, M. Taniguchi, Y. Koyama, T. Manabe, S. Yamagishi, Y. Bando, K. Imaizumi, Y. Tsujimoto, and M. Tohyama. 2004. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol.* 165:347-56.
- Hoozemans, J.J., R. Veerhuis, E.S. Van Haastert, J.M. Rozemuller, F. Baas, P. Eikelenboom, and W. Scheper. 2005. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 110:165-72.
- Hosokawa, N., I. Wada, K. Hasegawa, T. Yorihuzi, L.O. Tremblay, A. Herscovics, and K. Nagata. 2001. A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.* 2:415-22.
- Hsu, L.C., J.M. Park, K. Zhang, J.L. Luo, S. Maeda, R.J. Kaufman, L. Eckmann, D.G. Guiney, and M. Karin. 2004. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature.* 428:341-5.
- Hubbard, S.C., and R.J. Ivatt. 1981. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 50:555-83.
- Hutton, M., J. Perez-Tur, and J. Hardy. 1998. Genetics of Alzheimer's disease. *Essays Biochem.* 33:117-31.
- Ichijo, H., E. Nishida, K. Irie, P. ten Dijke, M. Saitoh, T. Moriguchi, M. Takagi, K. Matsumoto, K. Miyazono, and Y. Gotoh. 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* 275:90-4.
- Imaizumi, K., K. Miyoshi, T. Katayama, T. Yoneda, M. Taniguchi, T. Kudo, and M. Tohyama. 2001. The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1536:85-96.
- Iwawaki, T., R. Akai, K. Kohno, and M. Miura. 2004. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med.* 10:98-102.
- Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 88:347-54.
- Joza, N., S.A. Susin, E. Daugas, W.L. Stanford, S.K. Cho, C.Y. Li, T. Sasaki, A.J. Elia, H.Y. Cheng, L. Ravagnan, K.F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y.Y. Kong, T.W. Mak, J.C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer, and J.M. Penninger. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 410:549-54.
- Kamens, J., M. Paskind, M. Hugunin, R.V. Talanian, H. Allen, D. Banach, N. Bump, M. Hackett, C.G. Johnston, P. Li, and et al. 1995. Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1 beta-converting enzyme family of cysteine proteases. *J Biol Chem.* 270:15250-6.
- Kaneda, S., T. Yura, and H. Yanagi. 2000. Production of three distinct mRNAs of 150 kDa



- oxygen-regulated protein (ORP150) by alternative promoters: preferential induction of one species under stress conditions. *J Biochem (Tokyo)*. 128:529-38.
- Katayama, T., K. Imaizumi, A. Honda, T. Yoneda, T. Kudo, M. Takeda, K. Mori, R. Rozmahel, P. Fraser, P.S. George-Hyslop, and M. Tohyama. 2001. Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. *J Biol Chem*. 276:43446-54.
- Katayama, T., K. Imaizumi, N. Sato, K. Miyoshi, T. Kudo, J. Hitomi, T. Morihara, T. Yoneda, F. Gomi, Y. Mori, Y. Nakano, J. Takeda, T. Tsuda, Y. Itoyama, O. Murayama, A. Takashima, P. St George-Hyslop, M. Takeda, and M. Tohyama. 1999. Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 1:479-85.
- Kaufman, R.J. 2004. Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*. 29:152-8.
- Kaufman, R.J., L.C. Wasley, and A.J. Dorner. 1988. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem*. 263:6352-62.
- Kitao, Y., K. Ozawa, M. Miyazaki, M. Tamatani, T. Kobayashi, H. Yanagi, M. Okabe, M. Ikawa, T. Yamashima, D.M. Stern, O. Hori, and S. Ogawa. 2001. Expression of the endoplasmic reticulum molecular chaperone (ORP150) rescues hippocampal neurons from glutamate toxicity. *J Clin Invest*. 108:1439-50.
- Kobayashi, K., and S. Tagawa. 1999. Isolation of reductase for SoxR that governs an oxidative response regulon from *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 451:227-30.
- Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. 54:631-64.
- Krajewski, S., S. Tanaka, S. Takayama, M.J. Schibler, W. Fenton, and J.C. Reed. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*. 53:4701-14.
- Kruman, I., A.J. Bruce-Keller, D. Bredesen, G. Waeg, and M.P. Mattson. 1997. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 17:5089-100.
- Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher. 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*. 23:7448-59.
- Lee, K., W. Tirasophon, X. Shen, M. Michalak, R. Prywes, T. Okada, H. Yoshida, K. Mori, and R.J. Kaufman. 2002. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev*. 16:452-66.
- Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D.M. Romano, J. Oshima, W.H. Pettingell, C.E. Yu, P.D. Jondro, S.D. Schmidt, K. Wang, and et al. 1995a. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 269:973-7.
- Levy-Lahad, E., E.M. Wijsman, E. Nemens, L. Anderson, K.A. Goddard, J.L. Weber, T.D. Bird, and G.D. Schellenberg. 1995b. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*. 269:970-3.
- Lewen, A., P. Matz, and P.H. Chan. 2000. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma*. 17:871-90.
- Li, M., P. Baumeister, B. Roy, T. Phan, D. Foti, S. Luo, and A.S. Lee. 2000. ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol Cell Biol*. 20:5096-106.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, and X. Wang.

1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91:479-89.
- Li, W., S.M. Srinivasula, J. Chai, P. Li, J.W. Wu, Z. Zhang, E.S. Alnemri, and Y. Shi. 2002. Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol*. 9:436-41.
- Lin, M.T., C.C. Chang, S.T. Chen, H.L. Chang, J.L. Su, Y.P. Chau, and M.L. Kuo. 2004. Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation. *J Biol Chem*. 279:24015-23.
- Lindholm, D., H. Wootz, and L. Korhonen. 2006. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*. 13:385-92.
- Lu, P.D., C. Jousse, S.J. Marciniak, Y. Zhang, I. Novoa, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D. Ron, and H.P. Harding. 2004. Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *Embo J*. 23:169-79.
- Lukacs, G.L., A. Mohamed, N. Kartner, X.B. Chang, J.R. Riordan, and S. Grinstein. 1994. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *Embo J*. 13:6076-86.
- Ma, Y., and S. Taylor. 2002. A 15-residue bifunctional element in D-AKAP1 is required for both endoplasmic reticulum and mitochondrial targeting. *J Biol Chem*. 277:27328-36.
- Maggi, L.B., Jr., M.R. Heitmeier, D. Scheuner, R.J. Kaufman, R.M. Buller, and J.A. Corbett. 2000. Potential role of PKR in double-stranded RNA-induced macrophage activation. *Embo J*. 19:3630-8.
- Marques, C.A., U. Keil, A. Bonert, B. Steiner, C. Haass, W.E. Muller, and A. Eckert. 2003. Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *J Biol Chem*. 278:28294-302.
- Martinez, I.M., and M.J. Chrispeels. 2003. Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell*. 15:561-76.
- Martinou, J.C., and D.R. Green. 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:63-7.
- Mattson, M.P., and G. Kroemer. 2003. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med*. 9:196-205.
- Mattson, M.P., F.M. LaFerla, S.L. Chan, M.A. Leissring, P.N. Shepel, and J.D. Geiger. 2000. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 23:222-9.
- Mattson, M.P., and Magnus, T. 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nature Reviews*. 7: 278-294.
- Mattson, M.P., R.E. Rydel, I. Lieberburg, and V.L. Smith-Swintosky. 1993. Altered calcium signaling and neuronal injury: stroke and Alzheimer's disease as examples. *Ann N Y Acad Sci*. 679:1-21.
- Matzno, S., S. Yasuda, Y. Kitada, T. Akiyoshi, N. Tanaka, S. Juman, K. Shinozuka, T. Nakabayashi, and K. Matsuyama. 2006. Clofibrate-induced apoptosis is mediated by Ca<sup>2+</sup>-dependent caspase-12 activation. *Life Sci*. 78:1892-9.
- Mengesdorf, T., S. Althausen, I. Oberndorfer, and W. Paschen. 2001. Response of neurons to an irreversible inhibition of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: relationship between global protein synthesis and expression and translation of individual genes. *Biochem J*. 356:805-12.
- Moreira, P.I., M.A. Smith, X. Zhu, M.S. Santos, C.R. Oliveira, and G. Perry. 2004. Therapeutic potential of oxidant mechanisms in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 4:995-1004.



- Mori, K. 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 101:451-4.
- Morishima, N., K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata, and Y. Yasuhiko. 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*. 277:34287-94.
- Munday, N.A., J.P. Vaillancourt, A. Ali, F.J. Casano, D.K. Miller, S.M. Molineaux, T.T. Yamin, V.L. Yu, and D.W. Nicholson. 1995. Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICERelII and ICERelIII, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J Biol Chem*. 270:15870-6.
- Nakagawa, T., and J. Yuan. 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. 150:887-94.
- Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B.A. Yankner, and J. Yuan. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 403:98-103.
- Naruse, S., G. Thinakaran, J.J. Luo, J.W. Kusiak, T. Tomita, T. Iwatsubo, X. Qian, D.D. Ginty, D.L. Price, D.R. Borchelt, P.C. Wong, and S.S. Sisodia. 1998. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron*. 21:1213-21.
- Nicholson, D.W., and N.A. Thornberry. 2003. Apoptosis. Life and death decisions. *Science*. 299:214-5.
- Nishitoh, H., A. Matsuzawa, K. Tobiume, K. Saegusa, K. Takeda, K. Inoue, S. Hori, A. Kakizuka, and H. Ichijo. 2002. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 16:1345-55.
- Nishitoh, H., M. Saitoh, Y. Mochida, K. Takeda, H. Nakano, M. Rothe, K. Miyazono, and H. Ichijo. 1998. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*. 2:389-95.
- Novoa, I., H. Zeng, H.P. Harding, and D. Ron. 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol*. 153:1011-22.
- Nunomura, A., R.J. Castellani, X. Zhu, P.I. Moreira, G. Perry, and M.A. Smith. 2006. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 65:631-41.
- Nunomura, A., G. Perry, M.A. Pappolla, R. Wade, K. Hirai, S. Chiba, and M.A. Smith. 1999. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 19:1959-64.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky, and P. Nicotera. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:552-65.
- Oyadomari, S., E. Araki, and M. Mori. 2002. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis*. 7:335-45.
- Oyebode, J.R., W.A. Barker, G. Blessed, D.J. Dick, and P.G. Britton. 1986. Cognitive functioning in Parkinson's disease: in relation to prevalence of dementia and psychiatric diagnosis. *Br J Psychiatry*. 149:720-5.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., Hotamisligil, G.S. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 306: 457-461.
- Pahl, H.L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 18:6853-66.
- Pahl, H.L., and P.A. Baeuerle. 1996. Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett*. 392:129-36.
- Pakula, T.M., M. Laxell, A. Huuskonen, J. Uusitalo, M. Saloheimo, and M. Penttila. 2003. The effects of drugs inhibiting protein secretion in the filamentous fungus *Trichoderma*

- reesei. Evidence for down-regulation of genes that encode secreted proteins in the stressed cells. *J Biol Chem.* 278:45011-20.
- Pappolla, M.A., R.A. Omar, K.S. Kim, and N.K. Robakis. 1992. Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 140:621-8.
- Paschen, W. 2000. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? *Brain Res Bull.* 53:409-13.
- Paschen, W. 2001. Dependence of vital cell function on endoplasmic reticulum calcium levels: implications for the mechanisms underlying neuronal cell injury in different pathological states. *Cell Calcium.* 29:1-11.
- Paschen, W. 2003. Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium.* 34:365-83.
- Pearce, R.K., A. Owen, S. Daniel, P. Jenner, and C.D. Marsden. 1997. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 104:661-77.
- Pedersen, W.A., W. Fu, J.N. Keller, W.R. Markesbery, S. Appel, R.G. Smith, E. Kasarskis, and M.P. Mattson. 1998. Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Neurol.* 44:819-24.
- Perry, T.L., D.V. Godin, and S. Hansen. 1982. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett.* 33:305-10.
- Perry, T.L., and V.W. Yong. 1986. Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci Lett.* 67:269-74.
- Ping, B., X. He, W. Xia, D.F. Lee, Y. Wei, D. Yu, G. Mills, D. Shi, and M.C. Hung. 2006. Cytoplasmic expression of p21CIP1/WAF1 is correlated with IKKbeta overexpression in human breast cancers. *Int J Oncol.* 29:1103-10.
- Putchu, G.V., S. Le, S. Frank, C.G. Besirli, K. Clark, B. Chu, S. Alix, R.J. Youle, A. LaMarche, A.C. Maroney, and E.M. Johnson, Jr. 2003. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron.* 38:899-914.
- Rangachari, V., D.K. Reed, B.D. Moore, and T.L. Rosenberry. 2006. Secondary structure and interfacial aggregation of amyloid-beta(1-40) on sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry.* 45:8639-48.
- Rao, R.V., A. Peel, A. Logvinova, G. del Rio, E. Hermel, T. Yokota, P.C. Goldsmith, L.M. Ellerby, H.M. Ellerby, and D.E. Bredesen. 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett.* 514:122-8.
- Reddy, R.K., J. Lu, and A.S. Lee. 1999. The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94 with Ca(2+)-binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 274:28476-83.
- Refolo, L.M., B. Malester, J. LaFrancois, T. Bryant-Thomas, R. Wang, G.S. Tint, K. Sambamurti, K. Duff, and M.A. Pappolla. 2000. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* 7:321-31.
- Refolo, L.M., M.A. Pappolla, J. LaFrancois, B. Malester, S.D. Schmidt, T. Thomas-Bryant, G.S. Tint, R. Wang, M. Mercken, S.S. Petanceska, and K.E. Duff. 2001. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 8:890-9.
- Reimold, A.M., A. Etkin, I. Clauss, A. Perkins, D.S. Friend, J. Zhang, H.F. Horton, A. Scott, S.H. Orkin, M.C. Byrne, M.J. Grusby, and L.H. Glimcher. 2000. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev.* 14:152-7.
- Repetto, M. 1997. Toxicologia fundamental. Ediciones Diaz Santos, S.A, Madrid. 129-161 pp.

- Richard, F., and P. Amouyel. 2001. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 412:1-12.
- Richter, C. 1995. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol.* 27:647-53.
- Richter, C., V. Gogvadze, R. Laffranchi, R. Schlapbach, M. Schweizer, M. Suter, P. Walter, and M. Yaffee. 1995. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1271:67-74.
- Rogaev, E.I., R. Sherrington, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, and et al. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 376:775-8.
- Ron, D. 2002. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest.* 110:1383-8.
- Ron, D., and J.F. Habener. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6:439-53.
- Roucou, X., and J.C. Martinou. 2001. Conformational change of Bax: a question of life or death. *Cell Death Differ.* 8:875-7.
- Rushmore, T.H., M.R. Morton, and C.B. Pickett. 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem.* 266:11632-9.
- Saunders, A.M., W.J. Strittmatter, D. Schmechel, P.H. George-Hyslop, M.A. Pericak-Vance, S.H. Joo, B.L. Rosi, J.F. Gusella, D.R. Crapper-MacLachlan, M.J. Alberts, and et al. 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 43:1467-72.
- Sayre, L.M., M.G. Zagorski, W.K. Surewicz, G.A. Krafft, and G. Perry. 1997. Mechanisms of neurotoxicity associated with amyloid beta deposition and the role of free radicals in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Chem Res Toxicol.* 10:518-26.
- Scorrano, L., S.A. Oakes, J.T. Opferman, E.H. Cheng, M.D. Sorcinelli, T. Pozzan, and S.J. Korsmeyer. 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science.* 300:135-9.
- Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T.D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, and S. Younkin. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2:864-70.
- Scheuner, D., B. Song, E. McEwen, C. Liu, R. Laybutt, P. Gillespie, T. Saunders, S. Bonner-Weir, and R.J. Kaufman. 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell.* 7:1165-76.
- Schneider, I., D. Reverse, I. Dewachter, L. Ris, N. Caluwaerts, C. Kuiperi, M. Gilis, H. Geerts, H. Kretzschmar, E. Godaux, D. Moechars, F. Van Leuven, and J. Herms. 2001. Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation. *J Biol Chem.* 276:11539-44.
- Schroder, M., and R.J. Kaufman. 2005a. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res.* 569:29-63.
- Schroder, M., and R.J. Kaufman. 2005b. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 74:739-89.

- Schroder, M., R. Schafer, and P. Friedl. 2002. Induction of protein aggregation in an early secretory compartment by elevation of expression level. *Biotechnol Bioeng.* 78:131-40.
- Schweizer, A., J.A. Fransen, K. Matter, T.E. Kreis, L. Ginsel, and H.P. Hauri. 1990. Identification of an intermediate compartment involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. *Eur J Cell Biol.* 53:185-96.
- Shen, X., R.E. Ellis, K. Lee, C.Y. Liu, K. Yang, A. Solomon, H. Yoshida, R. Morimoto, D.M. Kurnit, K. Mori, and R.J. Kaufman. 2001. Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell.* 107:893-903.
- Shen, X., K. Zhang, and R.J. Kaufman. 2004. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat.* 28:79-92.
- Shen, Y., L. Meunier, and L.M. Hendershot. 2002. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J Biol Chem.* 277:15947-56.
- Sherrington, R., E.I. Rogaev, Y. Liang, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, and et al. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 375:754-60.
- Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 399:483-7.
- Shinohara, T., K. Ikesugi, and M.L. Mulhern. 2006. Cataracts: role of the unfolded protein response. *Med Hypotheses.* 66:365-70.
- Siebenlist, U. 2001. Signal transduction. Barriers come down. *Nature.* 412:601-2.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., Simons, K. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of B-amyloid in hippocampal neurons. *Neurobiology.* 95: 6460-6464.
- Sjogren, M., and K. Blennow. 2005. The link between cholesterol and Alzheimer's disease. *World J Biol Psychiatry.* 6:85-97.
- Smith, M.A., and G. Perry. 1994. Alzheimer disease: an imbalance of proteolytic regulation? *Med Hypotheses.* 42:277-9.
- Smith, M.A., P.L. Richey Harris, L.M. Sayre, J.S. Beckman, and G. Perry. 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 17:2653-7.
- Smith, M.A., K. Wehr, P.L. Harris, S.L. Siedlak, J.R. Connor, and G. Perry. 1998. Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 788:232-6.
- Soldani, C., and A.I. Scovassi. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis.* 7:321-8.
- Sparks, D.L., S.W. Scheff, J.C. Hunsaker, 3rd, H. Liu, T. Landers, and D.R. Gross. 1994. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol.* 126:88-94.
- Srinivasula, S.M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, and E.S. Alnemri. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* 1:949-57.
- Srivastava, S.P., K.U. Kumar, and R.J. Kaufman. 1998. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 273:2416-23.
- Stadtman, E.R., and C.N. Oliver. 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem.* 266:2005-8.
- Suen, K.C., K.F. Lin, W. Elyaman, K.F. So, R.C. Chang, and J. Hugon. 2003. Reduction of calcium release from the endoplasmic reticulum could only provide partial neuroprotection against beta-amyloid peptide toxicity. *J Neurochem.* 87:1413-26.
- Szabadkai, G., and R. Rizzuto. 2004. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett.* 567:111-5.



- Szlufcik, K., L. Missiaen, J.B. Parys, G. Callewaert, and H. De Smedt. 2006. Uncoupled IP<sub>3</sub> receptor can function as a Ca<sup>2+</sup>-leak channel: cell biological and pathological consequences. *Biol Cell*. 98:1-14.
- Takeda, A., G. Perry, N.G. Abraham, B.E. Dwyer, R.K. Kutty, J.T. Laitinen, R.B. Petersen, and M.A. Smith. 2000. Overexpression of heme oxygenase in neuronal cells, the possible interaction with Tau. *J Biol Chem*. 275:5395-9.
- Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267:1456-62.
- Tirasophon, W., A.A. Welihinda, and R.J. Kaufman. 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev*. 12:1812-24.
- Tolleshaug, H., K.K. Hobgood, M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 1983. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor. *Cell*. 32:941-51.
- Travers, K.J., C.K. Patil, L. Wodicka, D.J. Lockhart, J.S. Weissman, and P. Walter. 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 101:249-58.
- Urano, F., A. Bertolotti, and D. Ron. 2000a. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 113 Pt 21:3697-702.
- Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H.P. Harding, and D. Ron. 2000b. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 287:664-6.
- Vaux, D.L., and J. Silke. 2003. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 304:499-504.
- Venugopal, R., and A.K. Jaiswal. 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:14960-5.
- Verhagen, A.M., J. Silke, P.G. Ekert, M. Pakusch, H. Kaufmann, L.M. Connolly, C.L. Day, A. Tikoo, R. Burke, C. Wrobel, R.L. Moritz, R.J. Simpson, and D.L. Vaux. 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem*. 277:445-54.
- Verkhatsky, A., and E.C. Toescu. 2003. Endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis and neuronal death. *J Cell Mol Med*. 7:351-61.
- Vicente, M.C. 2002. Estrés de retículo endoplásmico asociado a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. In *Bioquímica y Biología Molecular*. Vol. Licenciado con grado. Autónoma, Madrid. 42.
- Walter, J., A. Capell, J. Grunberg, B. Pesold, A. Schindzielorz, R. Prior, M.B. Podlisny, P. Fraser, P.S. Hyslop, D.J. Selkoe, and C. Haass. 1996. The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Mol Med*. 2:673-91.
- Wang, L.S., Z.Z. Wu, and F.C. He. 1996. [Genetic control of programmed cell death]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 27:153-6.
- Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 15:2922-33.
- Wang, X.Z., H.P. Harding, Y. Zhang, E.M. Jolicoeur, M. Kuroda, and D. Ron. 1998a. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *Embo J*. 17:5708-17.
- Wang, X.Z., M. Kuroda, J. Sok, N. Batchvarova, R. Kimmel, P. Chung, H. Zinszner, and D. Ron. 1998b. Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *Embo J*. 17:3619-30.
- Waris, G., Tardif, K.D., and Siddiqui, A. 2002. Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces and ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-κB and

- STAT-3. *Biochemical Pharmacology*. 64: 1425-30.
- Webb, S.E., and A.L. Miller. 2003. Calcium signalling during embryonic development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:539-51.
- Wei, M.C., W.X. Zong, E.H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292:727-30.
- Whitfield, J., S.J. Neame, L. Paquet, O. Bernard, and J. Ham. 2001. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron*. 29:629-43.
- Wolozin, B. 2004. Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron*. 41:7-10.
- Xu, Z., G.D. Ford, D.R. Crosslan, J. Jiang, A. Gates, R. Allen, and B.D. Ford. 2005. Neuroprotection by neuregulin-1 following focal stroke is associated with the attenuation of ischemia-induced pro-inflammatory and stress gene expression. *Neurobiol Dis*. 19:461-70.
- Yagami, T., K. Ueda, K. Asakura, S. Hata, T. Kuroda, T. Sakaeda, N. Takasu, K. Tanaka, T. Gemba, and Y. Hori. 2002. Human group IIA secretory phospholipase A2 induces neuronal cell death via apoptosis. *Mol Pharmacol*. 61:114-26.
- Yamamoto, K., H. Ichijo, and S.J. Korsmeyer. 1999. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*. 19:8469-78.
- Yang, Y., R.S. Turner, and J.R. Gaut. 1998. The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Abeta40 and Abeta42 secretion. *J Biol Chem*. 273:25552-5.
- Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori. 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*. 273:33741-9.
- Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, and K. Mori. 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 107:881-91.
- Yoshida, H., T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, and K. Mori. 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*. 20:6755-67.
- Yoshida, Y. 2003. A novel role for N-glycans in the ERAD system. *J Biochem (Tokyo)*. 134:183-90.
- Yuan, J., and B.A. Yankner. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 407:802-9.
- Zemlan, F.P., O.J. Thienhaus, and H.B. Bosmann. 1989. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res*. 476:160-2.
- Zhao, H., M.A. Yenari, D. Cheng, R.M. Sapolsky, and G.K. Steinberg. 2005. Biphasic cytochrome c release after transient global ischemia and its inhibition by hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 25:1119-29.
- Zhao, S., X.Y. Du, M.Q. Chai, J.S. Chen, Y.C. Zhou, and J.G. Song. 2002. Secretory







